

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I,
Klinikum Großhadern
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Steinbeck

Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Long-QT-Syndrom und Brugada-Syndrom

Eine systematische Analyse an vier ausgewählten Fällen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Stefan Schäfer
aus Berlin

2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. A. Sellmayer

Prof. Dr. rer. nat. S. Nees

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. S. Kääb

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2007

**Meiner Ehefrau Martina
und meinen Eltern
gewidmet**

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Ionenkanalerkrankungen als Modell der gestörten myokardialen Repolarisation	1
1.2 Elektrophysiologische Grundlagen der Herzaktion	2
1.3 Das Long-QT-Syndrom (LQTS)	4
1.3.1 Einführung	4
1.3.2 Ätiologie des angeborenen LQTS	5
1.3.3 Pathophysiologie des LQTS	7
1.3.3.1 LQT1 und LQT2: Kaliumkanäle I_{Ks} und I_{Kr}	8
1.3.3.2 LQT3: Natriumkanal I_{Na}	11
1.3.4 Klinisches Erscheinungsbild des LQTS	12
1.3.4.1 EKG-Veränderungen	12
1.3.4.2 Torsades de Pointes-Tachykardien	13
1.3.4.3 Synkopen	14
1.3.4.4 Erstmanifestation	14
1.3.5 Diagnostik und Risikostratifizierung beim LQTS	15
1.3.6 Prognose und Therapie des LQTS	16
1.4 Das Brugada-Syndrom	18
1.4.1 Einleitung	18
1.4.2 Ätiologie des Brugada-Syndroms	18
1.4.3 Pathophysiologie des Brugada-Syndroms	19
1.4.4 Klinisches Erscheinungsbild des Brugada-Syndroms	20
1.4.5 Diagnostik und Risikostratifizierung beim Brugada-Syndrom	21
1.4.6 Prognose und Therapie des Brugada-Syndroms	22
1.5 Zielsetzung der Arbeit	23

2 Patienten, Methoden und Materialien	25
2.1 Methoden zur phänotypischen Charakterisierung	25
2.1.1 Patientengruppe	25
2.1.2 EKG-Auswertung	25
2.1.3 Anamneseerhebung	26
2.1.4 Diagnosestellung	26
2.1.4.1 Diagnose LQTS	26
2.1.4.2 Diagnose Brugada-Syndrom	27
2.1.5 Familienanamnese	28
2.2 Methoden zur genotypischen Charakterisierung	29
2.3 Methoden zur funktionellen Charakterisierung	30
2.3.1 Molekularbiologische Methoden	30
2.3.1.1 PCR-Mutagenese	30
2.3.1.1.1 Overlap-Extension-PCR	30
2.3.1.1.1.1 PCR-Methode	30
2.3.1.1.1.2 PCR-Primer	30
2.3.1.1.1.3 PCR-Protokoll	32
2.3.1.1.1.4 Ligation in Plasmidvektoren	33
2.3.1.1.2 QuickChange-XL site-directed mutagenesis Kit	33
2.3.1.1.2.1 PCR-Methode	33
2.3.1.1.2.2 PCR-Primer	34
2.3.1.1.2.3 PCR-Protokoll	35
2.3.1.1.3 PCR-Templates	35
2.3.1.1.4 Gelelektrophorese von DNA	36
2.3.1.2 Funktionelle Expression	37
2.3.1.2.1 Transformation der Plasmidvektoren in Bakterienkulturen	37
2.3.1.2.2 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	37
2.3.1.2.3 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäure	38
2.3.1.2.4 Sequenzierung der Mutanten	38
2.3.1.2.5 Transfektion von Zellen	39
2.3.1.3 Lösungen für Molekularbiologie und Zellbiologie	40
2.3.1.4 Enzyme und Oligonukleotide	40

2.3.2	Elektrophysiologische Methoden	41
2.3.2.1	Aufbau des Messplatzes	41
2.3.2.2	Durchführung der Patch-Clamp Messung	41
2.3.2.3	Lösungen für Elektrophysiologie	42
3	Ergebnisse	43
3.1.	Indexpatient M.P. (LQT1)	43
3.1.1	Phänotypische Charakterisierung	43
3.1.1.1	Anamnese	43
3.1.1.2	EKG-Diagnostik	43
3.1.1.3	Diagnosestellung	44
3.1.2	Genotypische Charakterisierung	45
3.1.3	Familienanamnese	46
3.1.4	Funktionelle Charakterisierung	47
3.1.4.1	Funktionelle Expression der Mutation T322A im Gen KCNQ1	47
3.1.4.2	Elektrophysiologische Untersuchung der Mutation T322A im Gen KCNQ1	49
3.2	Indexpatientin C.W. (LQT1)	50
3.2.1	Phänotypische Charakterisierung	50
3.2.1.1	Anamnese	50
3.2.1.2	EKG-Diagnostik	50
3.2.1.3	Diagnosestellung	51
3.2.2	Genotypische Charakterisierung	52
3.2.3	Familienanamnese	53
3.2.4	Funktionelle Charakterisierung	56
3.2.4.1	Funktionelle Expression der Mutation del185-187 im Gen KCNQ1	56
3.2.4.2	Elektrophysiologische Untersuchung der Mutation del185-187 im Gen KCNQ1	57
3.3	Indexpatientin A.B. (LQT3)	58
3.3.1	Phänotypische Charakterisierung	58
3.3.1.1	Anamnese	58
3.3.1.2	EKG-Diagnostik	58
3.3.1.3	Diagnosestellung	59

3.3.2	Genotypische Charakterisierung	59
3.3.3	Familienanamnese	60
3.3.4	Funktionelle Charakterisierung	62
3.3.4.1	Funktionelle Expression der Mutation delF1617 im Gen SCN5A	62
3.3.4.2	Elektrophysiologische Untersuchung der Mutation del1617 im Gen SCN5A	63
3.4	Indexpatient A.K. (Brugada-Syndrom)	64
3.4.1	Phänotypische Charakterisierung	64
3.4.1.1	Anamnese	64
3.4.1.2	EKG-Diagnostik	65
3.4.1.3	Diagnosestellung	65
3.4.2	Genotypische Charakterisierung	66
3.4.3	Familienanamnese	67
3.4.4	Funktionelle Charakterisierung	68
3.4.4.1	Funktionelle Expression der Mutation R878L im Gen SCN5A	68
3.4.4.2	Elektrophysiologische Untersuchung der Mutation R878L im Gen SCN5A	69
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	70
4	Diskussion	72
4.1	Diskussion der Methoden	72
4.1.1	Phänotypische Charakterisierung	72
4.1.2	Genotypische Charakterisierung	74
4.1.3	Funktionelle Charakterisierung	75
4.1.3.1	PCR-Mutagenese	75
4.1.3.2	Vektoren und Zellmodelle	76
4.1.3.3	Elektrophysiologische Untersuchungen	77
4.2	Diskussion der Ergebnisse	78
4.2.1	Indexpatient M.P. (LQT1)	78
4.2.2	Indexpatientin C.W. (LQT1)	80
4.2.3	Indexpatientin A.B. (LQT3)	82
4.2.4	Indexpatient A.K. (Brugada-Syndrom)	83

4.3 Korrelation von Phänotyp und Genotyp	85
4.4 Empfehlungen zur Untersuchung einer Genotyp-Phänotyp Korrelation bei LQTS und Brugada-Syndrom	86
5 Zusammenfassung	89
6 Literaturverzeichnis	91
7 Danksagungen	104
8 Lebenslauf	105

1 Einleitung

1.1 Ionenkanalerkrankungen als Modelle der gestörten myokardialen Repolarisation

Als plötzlicher Herztod (sudden cardiac death - SCD) wird nach Definition der europäischen Gesellschaft für Kardiologie ein natürlicher Tod aus kardialer Ursache mit plötzlichem Bewusstseinsverlust innerhalb einer Stunde nach Beginn der akuten Symptomatik bezeichnet. Die jährliche Inzidenz wird mit zirka 8 zu 1000 angegeben (Sans et al., 1997). Hauptursache für den plötzlichen Herztod sind tachykarde ventrikuläre Arrhythmien, die durch eine Vielzahl von Erkrankungen hervorgerufen werden können (Buob et al., 2002). Zirka 90 - 95 % der Fälle von plötzlichem Herztod werden durch strukturelle Veränderungen verursacht. Dazu gehören zu 80 % die koronare Herzkrankheit und zu 10 - 15 % die dilatative und hypertrophe Kardiomyopathie (Priori et al., 2001). Bei jeder Ursache gilt eine gestörte myokardiale Repolarisation als wesentliches Substrat der lebensbedrohlichen Arrhythmien. Bei 5 - 10 % der Betroffenen mit überlebtem plötzlichem Herztod können jedoch keine ursächlichen strukturellen Herzerkrankungen erfasst werden (Priori et al., 2001). Zu dieser Gruppe gehören genetisch bedingte Arrhythmie-Syndrome, wie das Long-QT-Syndrom und das Brugada-Syndrom, sowie in seltenen Fällen das Andersen-Syndrom und katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardien (CPVT) (Vatta et al., 2000). Die Mehrzahl dieser Krankheitsbilder ist auf Veränderungen von Ionenkanälen zurückzuführen. Diese primär arrhythmogenen Erkrankungen, zu denen das Long-QT-Syndrom und das Brugada-Syndrom gehören, werden unter dem Begriff „kardiale Ionenkanalerkrankungen“ zusammengefasst. Ursächlich liegen den kardialen Ionenkanalerkrankungen Mutationen in Genen zugrunde, die für myokardiale Ionenkanäle kodieren. Diese Mutationen können je nach Art und Lokalisation zu Funktionseinschränkungen oder Funktionsverlusten des betroffenen Proteins und damit auch des gesamten Ionenkanals führen. Infolge dessen werden pathologische Störungen der elektrophysiologischen Eigenschaften des betroffenen Myokards hervorgerufen, die sich klinisch als Arrhythmien manifestieren können.

Eine inhomogene Repolarisation als Ursache für das Auftreten ventrikulärer Arrhythmien charakterisiert viele kardiale Ionenkanalerkrankungen, aber auch Erkrankungen wie Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz, die deshalb als Formen des erworbenen Long-QT-Syndroms betrachtet werden (Übersicht in Marban, 1999).

Untersuchungen zur Arrhythmogenese und zu den molekulargenetischen Grundlagen bestimmter Modellerkrankungen wie das Long-QT-Syndrom und das Brugada-Syndrom tragen daher wesentlich zum besseren Verständnis der Pathophysiologie häufiger ventrikulärer Arrhythmien bei. Trotz aller wissenschaftlichen Untersuchungen bleibt es jedoch aktuell schwierig, einen klaren Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp zu etablieren. Die vorliegende Arbeit versucht exemplarisch für das Long-QT-Syndrom und das Brugada-Syndrom einen systematischen Ansatz zum besseren Verständnis der Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp darzustellen.

1.2 Elektrophysiologische Grundlagen der Herzaktion

Die elektrische Aktivität von Herzmuskelzellen beruht auf der Wirkung spannungsabhängiger Ionenkanäle. Diese Kanäle bilden als Membranproteine hydrophile Poren durch die Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran und transportieren bestimmte anorganische Ionen. Sie öffnen und schließen sich häufig in Abhängigkeit von Veränderungen des elektrischen Potentials über der Plasmamembran. Dadurch entsteht ein Ionenstrom durch die Membran, der die elektrische Ladung des Zellinneren bestimmt.

Das kardiale Aktionspotential ist das Ergebnis des komplexen zeitlichen Zusammenspiels verschiedener Ionenkanäle. Über Natrium- und Kalziumkanäle erfolgt der depolarisierende Einstrom von positiv geladenen Natrium- und Kalziumionen in das Zellinnere und damit die Entstehung des Aktionspotentials. Kaliumkanäle regulieren den repolarisierenden Ausstrom von positiv geladenen Kaliumionen aus dem Zellinneren. Die Länge des Aktionspotentials wird dabei bestimmt durch das Gleichgewicht zwischen repolarisierenden und depolarisierenden Strömen. Eine Verlängerung des Aktionspotentials kann grundsätzlich durch ein Überwiegen depolarisierender Ströme oder durch eine Reduktion repolarisierender Ströme erklärt werden.

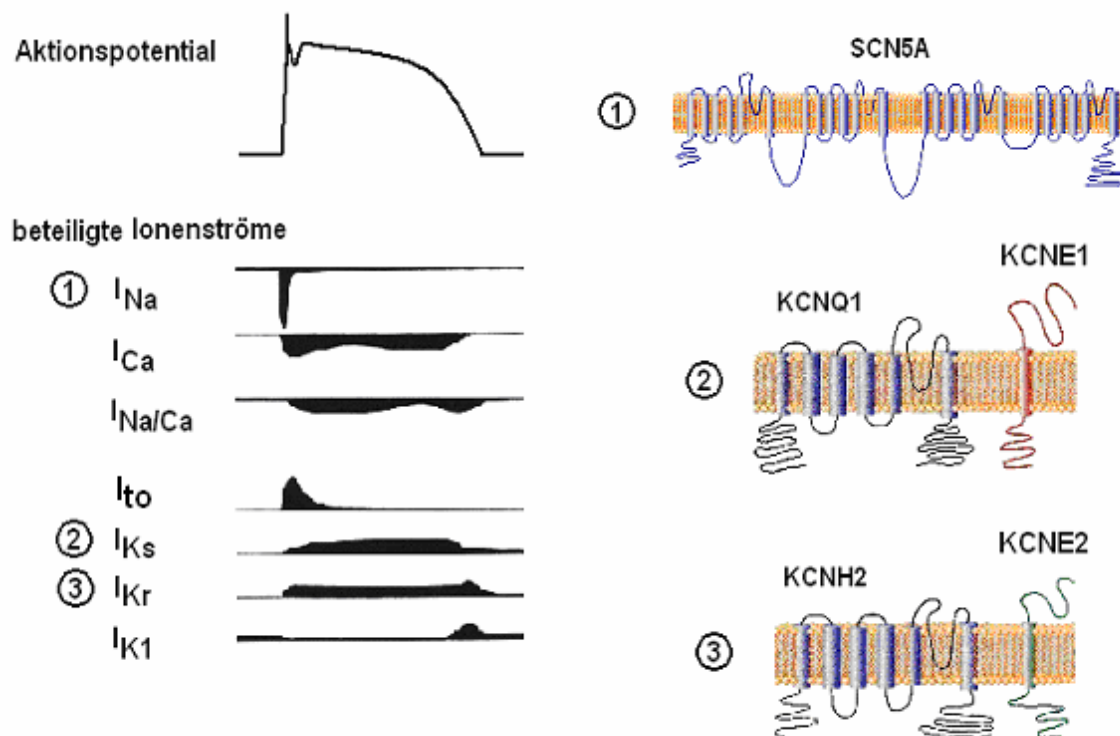


Abbildung 1: Linke Seite: Schematisches monophasisches Aktionspotential einer humanen Herzmuskelzelle mit einer Auswahl der beteiligten Ionenströme. Depolarisierende Ströme sind nach unten gerichtet, repolarisierende nach oben. Rechte Seite: Schematische Darstellung der α - und β -Untereinheiten der Ionenkanäle I_{Na} , I_{Ks} und I_{Kr} (von oben nach unten) mit Bezeichnungen der jeweils kodierenden Gene.

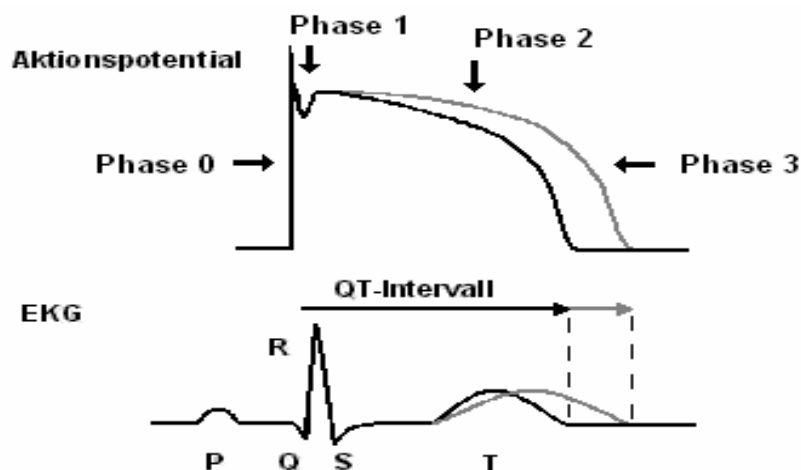


Abbildung 2: Aktionspotential einer humanen Herzmuskelzelle mit Bezeichnung der Phasen. Die graue Linie kennzeichnet eine Repolarisationsverlängerung. Darunter Darstellung eines zeitentsprechenden Standard-Elektrokardiogramms mit Bezeichnung der Wellen und Zacken, sowie des QT-Intervalls.

Beim kardialen Aktionspotential wird der initiale Potentialanstieg (Phase 0) durch das Öffnen myokardialer Natriumkanäle und dem schnellen Einstrom von Natriumionen in das Zellinnere hervorgerufen (siehe Abbildung 1). Dadurch kommt es zu einem plötzlichen Wechsel vom Ruhepotential zur schnellen Depolarisation. In der Phase der frühen schnellen Repolarisation (Phase 1) bedingen verschiedene Ionenströme, vor allem der transiente, kalziumunabhängige Kaliumkanal I_{to} , die Rückführung des positiven Spannungsüberschusses und das Erreichen des Spannungsausgleichs. Die folgende Plateauphase (Phase 2) kommt durch einen konstanten Auswärtsstrom von Kaliumionen bei zusätzlichem Einstrom von Kalziumionen zustande. In dieser Phase besteht ein sensibles Gleichgewicht zwischen dem depolarisierenden Kalziumionen-Einstrom und dem repolarisierenden Kaliumionen-Ausstrom (Weidmann, 1951). Die Natriumkanäle sind zu diesem Zeitpunkt bereits zu einem großen Teil inaktiviert. Durch den anhaltenden Auswärtsstrom von Kaliumionen durch eine spannungsabhängige Aktivierung von Kaliumströmen und der zeitabhängigen Inaktivierung des Kalziumstromes kommt es in der Phase der späten Repolarisation (Phase 3) zu einem Abfall des Membranpotentials in Richtung des Ruhepotentials.

1.3 Das Long-QT-Syndrom (LQTS)

1.3.1 Einführung

Das Long-QT-Syndrom (LQTS) ist gekennzeichnet durch das namensgebende verlängerte QT-Intervall im Oberflächen-EKG, Synkopen sowie polymorphe ventrikuläre Tachykardien. Diese Arrhythmien vom Typ Torsades de Pointes können selbstterminierend sein oder in Kammerflimmern degenerieren. Unter dem Begriff angeborenes LQTS wird eine Gruppe von Herzrhythmusstörungen zusammengefasst, die sich genetisch voneinander unterscheiden lassen und überwiegend auf Mutationen myokardialer Ionenkanäle zurückzuführen sind. Bei zirka 70 - 80 % aller Patienten mit angeborenem LQTS konnten bisher Mutationen in sieben verschiedenen Kandidatengen identifiziert werden (Übersicht in Chiang, 2004). In den USA wird die Häufigkeit von Mutationsträgern auf 1 : 10.000 - 15.000 und die durch das LQTS verursachten Todesfälle auf jährlich 3.000 - 4.000 geschätzt (Wang et al., 1995; Roden und Spooner, 1999).

Neben Mutationen, die einen direkten Einfluss auf die kardiale Repolarisation ausüben können, werden eine Reihe exogener Faktoren mit einer QT-Intervall-Verlängerung und dem Risiko für Arrhythmien in Verbindung gebracht. Zu den Risikofaktoren des erworbenen LQTS gehören zahlreiche Medikamente, Elektrolytstörungen und das Vorliegen einer Herzinsuffizienz oder einer myokardialen Hypertrophie (Übersicht in Marban, 1999; Roden, 2004). Inwieweit beim erworbenen LQTS eine genetische Disposition vorliegt und diese auf Genvarianten der LQTS-Gene basiert, ist Gegenstand der Forschung (Roden et al., 1999; Pfeuffer et al., 2005).

1.3.2 Ätiologie des angeborenen LQTS

Beim angeborenen LQTS werden traditionell zwei Formen unterschieden. A. Jervell und F. Lange-Nielsen veröffentlichten 1957 den Fall einer norwegischen Familie, in der vier von sechs Kindern im EKG eine deutliche Verlängerung des QT-Intervalls aufwiesen und zudem an angeborener Taubheit und rezidivierenden Synkopen litten. Drei dieser Kinder starben an einem plötzlichen Herztod (Jervell und Lange-Nielsen, 1957). Heute werden Mutationen in den Genen KCNQ1 und KCNE1, wenn sie in homozygoter Form vorliegen und mit einer Innenohrschwerhörigkeit oder Taubheit assoziiert sind, als Jervell und Lange-Nielsen-Syndrom bezeichnet. Die Häufigkeit dieser autosomal rezessiv vererbten Erkrankung beträgt ca. 1 - 6 pro 1 Million Individuen (Fraser et al., 1964). Die Innenohrschwerhörigkeit wird dadurch erklärt, dass der beim Jervell und Lange-Nielsen-Syndrom betroffene Kaliumkanal in der Stria vascularis des Innenohres nachgewiesen wurde und Mutationen bei Homozygotie zu einem vollständigen Funktionsverlust der Kaliumkanäle und damit des Hörvermögens führen können (Neyroud et al., 1997).

C. Romano und O. Ward beschrieben unabhängig voneinander in den Jahren 1963 und 1964 Familien, in denen sie Verlängerungen des QT-Intervalls, Synkopen und Fälle von plötzlichem Herztod festgestellt hatten (Romano et al., 1963; Ward, 1964). Das nach ihnen benannte Romano-Ward-Syndrom ist die häufigere Form des LQTS und ist nicht mit Schwerhörigkeit assoziiert. Es weist hauptsächlich einen autosomal dominanten Erbgang auf, es wurden jedoch auch Fälle mit autosomal rezessivem Erbgang beschrieben (Priori et al., 1998). Die geschätzte Häufigkeit des Romano-Ward-Syndroms wird mit 1 pro 10 000 Individuen angegeben (Ackermann, 1998). Bisher wurden Mutationen in 7 verschiedenen Genen, die überwiegend für myokardiale Ionenkanäle kodieren, identifiziert. Die molekulare Klassifikation (LQT1 - 7) orientiert sich an den betroffenen Genen.

LQT1 ist die häufigste Form des LQTS und wird durch Mutationen im Gen KCNQ1 verursacht. Dieses Gen ist auf dem Chromosom 11p15.5 lokalisiert und kodiert die porenbildende Untereinheit des spannungsabhängigen Kaliumkanals I_{Ks} (Keating et al., 1991; Wang et al., 1996a). Mutationen im Gen KCNQ1 wurden bei circa 50 - 60% der Patienten mit LQTS identifiziert (Robbins, 2001). LQT2 ist die zweithäufigste Form des LQTS (20 - 30 %) und wird durch Mutationen im Gen KCNH2 verursacht (Curran et al., 1995; Robbins, 2001). KCNH2 ist auf dem Chromosom 7q35-36 lokalisiert und kodiert die porenbildende Untereinheit des spannungsabhängigen Kaliumkanals I_{Kr} (Jiang et al., 1994; Sanguinetti et al., 1995). Bei zirka 8 - 10 % der Patienten mit LQTS wurden Mutationen im Gen SCN5A identifiziert und unter dem Begriff LQT3 zusammengefasst (Wang et al., 1995, Splawski et al., 2000). Das Gen SCN5A ist auf dem Chromosom 3p21-24 lokalisiert und kodiert die porenbildende Untereinheit des myokardialen Natriumkanals I_{Na} (Jiang et al., 1994). Die molekulargenetischen Ursachen des LQT4 wurden erst in jüngster Zeit charakterisiert und basieren auf Mutationen im Gen ANKB. Dieses Gen ist auf dem Chromosom 4q25-27 lokalisiert und kodiert das Membran-Adapter-Protein Ankyrin-B. Mutationen in diesem Gen können zu einer Störung der zellulären Organisation von Ankyrin-bindenden Proteinen, wie die Na/K-ATPase, führen und damit die intrazelluläre Kalziumkonzentration verändern. Symptome des LQT4 sind Bradykardien, Herzfrequenzschwankungen und kardiale Arrhythmien (Schott et al., 1995; Mohler et al., 2003). Unter LQT5 und LQT6 werden Mutationen in den Genen KCNE1 und KCNE2 zusammengefasst. Diese Gene befinden sich auf dem Chromosom 21q22.1 und kodieren die regulatorischen β -Untereinheiten der myokardialen Kaliumkanäle I_{Ks} (LQT5) und I_{Kr} (LQT6) (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996a; Splawski et al., 1997; Abbott et al., 1999). Unter LQT7 werden Mutationen auf dem Gen KCNJ2 zusammengefasst, die zu einem verlängerten QT-Intervall im EKG führen (Tristani-Firouzi et al., 2002). Das Gen KCNJ2 ist auf dem Chromosom 17q23 lokalisiert und kodiert den einwärts-rektifizierenden Kaliumkanal Kir 2.1. Mutationen im Gen KCNJ2 sind hauptsächlich mit dem Anderson Syndrom assoziiert, einer seltenen Erkrankung mit spezifischen Fehlbildungen, paralytischen Episoden und kardialen Arrhythmien (Tawil et al., 1994; Plaster et al., 2001). Aktuelle Untersuchungen identifizierten zudem Mutationen im Gen KCNJ2, die sich klinisch ohne Anderson-Syndrom-assoziierte Fehlbildungen aber mit ventrikulären Arrhythmien im Kontext eines verlängerten QT-Intervalls manifestierten (Fodstad et al., 2004).

Form des LQTS	Gen (Alternativname)	Chromosom	Protein	relative Häufigkeit
LQT1	KCNQ1 (KVLQT1)	11p15.5	α -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks}	50 - 60 %
LQT2	KCNH2 (HERG)	7q35-36	α -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Kr}	20 - 30 %
LQT3	SCN5A	3q21-24	α -Untereinheit des Natriumkanals I_{Na}	8 - 10 %
LQT4	ANKB (ANK2)	4q25-27	Ankyrin-B	< 1 %
LQT5	KCNE1 (minK)	21q22.1-22.2	β -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks}	< 1 %
LQT6	KCNE2 (MiRP1)	21q22.1	β -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Kr}	< 1 %
LQT7	KCNJ2	17q23	Kaliumkanal Kir 2.1	< 1 %

Tabelle 1: Einteilung der Formen des LQTS (LQT1-7) beim Romano-Ward-Syndrom mit Bezeichnung der entsprechenden Gene, Chromosomen und betroffenen Proteine, sowie der relativen Häufigkeit.

1.3.3 Pathophysiologie des LQTS

Die Mehrzahl (zirka 70 – 80 %) der bisher identifizierten Mutationen beim LQTS ist mit den Formen LQT1, LQT2 und LQT3 assoziiert (Buob et al., 2002). Wie in Tabelle 1 dargestellt, sind für die Formen LQT1 und LQT2 ursächlich Störungen der repolarisierenden Kaliumkanäle I_{Ks} und I_{Kr} und für die Form LQT3 Störungen des depolarisierenden Natriumkanals I_{Na} verantwortlich. Diese drei Ionenkanäle sollen nachfolgend charakterisiert werden.

1.3.3.1 LQT1 und LQT2: Kaliumkanäle I_{Ks} und I_{Kr}

Die Kaliumströme I_{Ks} und I_{Kr} spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Plateauphase und der Phase der späten Repolarisation während des myokardialen Aktionspotentials (Kass, 1996). Diese Kaliumströme werden durch die Aktivierung von spannungs- und zeitabhängigen Kaliumkanälen hervorgerufen, die aufgrund ihrer langsamen bzw. verzögerten Aktivierung zu der Gruppe der verzögernd gleichrichtenden Kanäle (im englischen „delayed rectifier channels“) gehören (Kurokawa et al., 2001). Während der Öffnung dieser Kaliumkanäle durch eine positive Spannung in der Phase der Depolarisation entsteht durch den Konzentrationsgradienten von Kaliumionen über der Zellmembran ein Kaliumausstrom aus der Zelle. I_{Ks} ist ein langsam aktivierender und deaktivierender Strom (Takumi et al., 1988). Die langsame Deaktivierung von I_{Ks} kann eine adaptive Verkürzung des Aktionspotentials bei schnellen Herzfrequenzen und während β -adrenerger Stimulation bewirken (vergleiche Übersicht in Lehmann-Horn und Jurkat-Rott, 1999). Ein defekter Kaliumkanal I_{Ks} führt folglich vor allem bei tachykarden Herzfrequenzen zu einer inadäquaten Verkürzung des QT-Intervalls, was für die Pathogenese des LQT1 von Bedeutung ist (Ackermann et al., 2002). Die unterschiedliche Expression und Regulation des Kaliumkanals I_{Ks} in den einzelnen Schichten der ventrikulären Wand trägt zur Heterogenität der kardialen Repolarisation über die Breite der Ventrikelwand bei (Kurokawa et al., 2001). Der schnell aktivierende und deaktivierende Strom I_{Kr} zeigt im Gegensatz zu I_{Ks} eine homogenere Verteilung über die Schichten der ventrikulären Wand (Sanguinetti et al., 1991). Er ist vor allem durch zwei pathophysiologische Eigenschaften im Bezug auf das LQTS gekennzeichnet. Der Kaliumkanal I_{Kr} unterscheidet sich von anderen spannungsabhängigen Kaliumkanälen durch seine Form der C-Typ Inaktivierung (Rasmusson et al., 1998). Eine erniedrigte extrazelluläre Kaliumkonzentration kann bei I_{Kr} die Inaktivierung verstärken und damit zu einer Verlängerung der Repolarisation beziehungsweise des QT-Intervalls führen. Patienten mit gestörter Repolarisation (angeboren oder erworben) sollten deshalb Zustände von Hypokaliämie vermeiden. Zudem konnte in pharmakologischen Studien für eine große Anzahl von Medikamenten (zum Beispiel Antihistaminika wie Terfenadine) eine hohe Affinität zum Kaliumkanal I_{Kr} und eine Einschränkung seiner Funktion nachgewiesen werden (Mitcheson et al., 2000; Kamiya et al., 2001). Dieser Wirkungsmechanismus spielt bei der medikamentös induzierten Form des erworbenen LQTS eine wichtige Rolle (Roden, 2004).

Die beiden spannungsabhängigen Kaliumkanäle I_{Ks} und I_{Kr} bilden jeweils einen makromolekularen Signalkomplex bestehend aus einem Tetramer porenbildender α -Untereinheiten und den regulierenden β -Untereinheiten (Jan und Jan, 1990; Kass und Moss, 2003). Jede α -Untereinheit bildet sechs transmembranäre Segmente (S1 - S6) mit einer porenbildenden Region zwischen den Segmenten fünf und sechs, wobei der N- und der C-Terminus der Untereinheiten intrazellulär lokalisiert sind (Papazian et al., 1991) (siehe Abbildungen 3 und 4). Der Spannungs-Sensor besteht aus einer Sequenz aus positiv geladenen Aminosäuren in dem vierten transmembranären Segment. Die β -Untereinheiten sind über Adapterproteine mit dem C-terminalen Enden der α -Untereinheiten verbunden. An diese Adapterproteine können die regulierenden Enzyme Protein-Kinase A und Protein-Phosphatase1 anbinden und die Kanalaktivität beeinflussen (Catterall, 1988; Marx et al., 2002).

Die porenbildende α -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks} wird durch das Gen KCNQ1 kodiert und besteht aus 676 Aminosäuren (Wang et al., 1996a). Das Gen KCNE1 kodiert die regulierende β -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks} , welche aus 129 Aminosäuren und einem einzelnen transmembranären Segment besteht (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996a). Beim Kaliumkanal I_{Kr} wird die porenbildende α -Untereinheit durch das Gen KCNH2 kodiert. Sie besteht aus 1.159 Aminosäuren und bildet wie die α -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks} sechs transmembranäre Segmente mit einer porenbildenden Region zwischen den Segmenten fünf und sechs (Curran et al., 1995; Sanguinetti et al., 1996b). Die regulierende β -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Kr} wird durch das Gen KCNE2 kodiert und besteht aus einem einzelnen transmembranären Segment mit 123 Aminosäuren (Splawski et al., 1997).

In funktionellen Expressionsstudien konnte bei einer Vielzahl der identifizierten Mutationen in den Genen KCNQ1 und KCNH2 eine Funktionsminderung und zum Teil ein vollständiger Funktionsverlust der betroffenen Kaliumkanäle I_{Ks} und I_{Kr} nachgewiesen werden („loss of function“) (Chouabe et al., 1997; Shalaby et al., 1997; Wollnik et al., 1997). Der daraus resultierende verminderte Auswärtsstrom von Kaliumionen in der Phase der späten Repolarisation kann zu einer Verlängerung des Aktionspotentials führen (Vincent, 1998). Bei Co-Expressionen von Wildtyp-Genen und mutierten Genen wurde ein dominant-negativer Effekt beschrieben. Dieser Effekt erklärt sich aus der tetrameren Struktur der Kaliumkanäle I_{Ks} und I_{Kr} . Eine Mutation, welche zu einem vollständigen Funktionsverlust des Proteins führt, müsste bei Heterozygotie eine Reduktion des Stromes um 50 % zur Folge haben.

Untersuchungen zeigten jedoch bei Co-Expression von mutierten Genen und Wildtyp-Genen einen stärkeren Einfluss der Mutation auf die Kanalfunktion als rechnerisch angenommen. Anscheinend beeinflussen die mutierten Untereinheiten in dem porenbildenden Tetramer auch die Funktionsfähigkeit der Wildtyp-Untereinheiten (Chouabe et al., 1997; Shalaby et al., 1997).

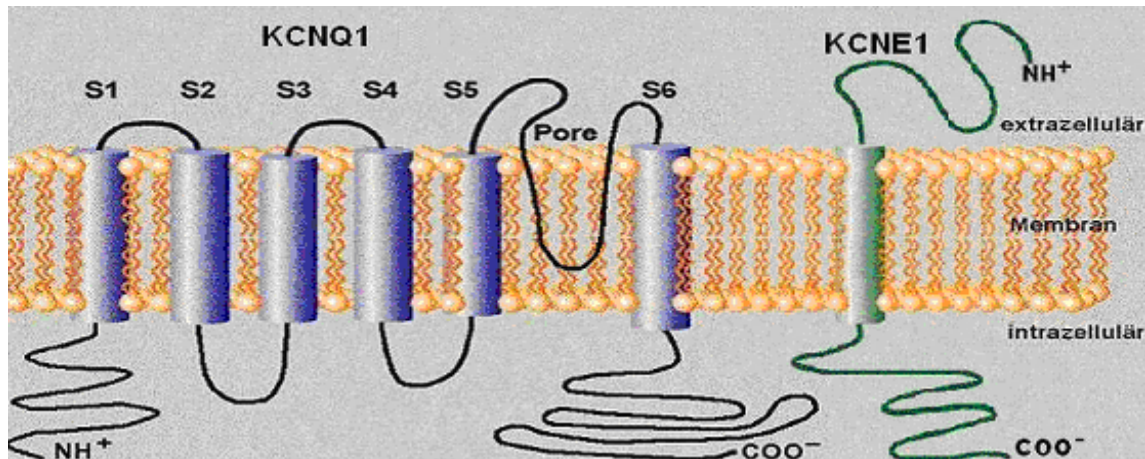


Abbildung 3: Schematische Darstellung der räumlichen Struktur der porenbildenden α -Untereinheit und der regulierenden β -Untereinheit des myokardialen Kaliumkanals I_{Ks} mit Bezeichnung der kodierenden Gene (nach L.A. Larsen, LQTS Database, http://www.ssi.dk/graphics/html/lqtsdb/lqt1_lg.htm).

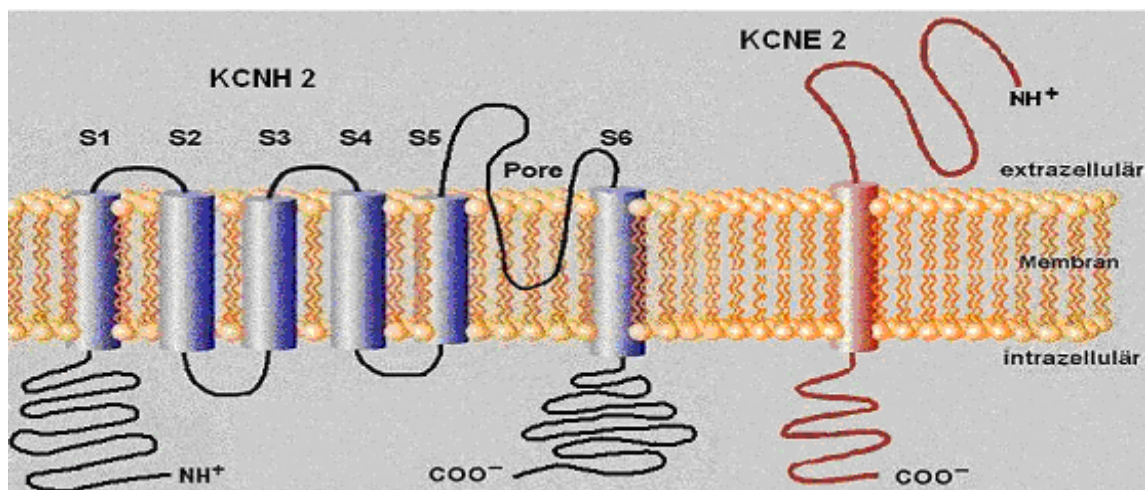


Abbildung 4: Schematische Darstellung der räumlichen Struktur der porenbildenden α -Untereinheit und der regulierenden β -Untereinheit des myokardialen Kaliumkanals I_{Kr} mit Bezeichnung der kodierenden Gene (nach L.A. Larsen, LQTS Database, http://www.ssi.dk/graphics/html/lqtsdb/lqt1_lg.htm).

1.3.3.2 LQT3: Natriumkanal I_{Na}

Der myokardiale Natriumkanal I_{Na} ist für den initialen Potentialanstieg (Phase 0) des kardialen Aktionspotentials verantwortlich und wird durch das Gen SCN5A kodiert. Der Kanal besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit etwa 2000 Aminosäuren, die sich in 4 homologe Domänen (D1 - D4) aufteilt (Wang et al., 1996b). Durch seine homogene Struktur (Monomer) ist ein dominant-negativer Effekt, wie bei den Kaliumkanälen I_{Ks} und I_{Kr} beschrieben, grundsätzlich ausgeschlossen. Jede Domäne enthält 6 transmembranäre Segmente (S1 - S6) (siehe Abbildung 5). Jeweils die Peptidschleife (P-Loop) zwischen den transmembranären Segmenten S5 und S6 der vier Domänen bildet das Innere der Pore, durch die Natrium-Ionen den offenen Kanal durchdringen können (Marban et al., 1998; Sato et al., 1998). Das Segment S4 enthält wie bei den Kaliumkanälen I_{Kr} und I_{Ks} jeweils positiv geladene Aminosäureseitenketten und dient als Spannungssensor, der seine Lage bei Änderung des Membranpotentials zum Extrazellularraum hin verschiebt (Stühmer et al., 1989). Dadurch wird ein Konformationswechsel bewirkt, wodurch sich die Pore des Ionenkanals öffnet. Nach der kurzzeitigen Aktivierung des Natriumkanals während der Phase 0 des Aktionspotentials geht dieser in einen stabilen inaktiven Zustand über (vergleiche Übersicht in Lehmann-Horn und Jurkat-Rott, 1999). Beim LQT3 scheint der stabile inaktive Zustand der Natriumkanäle durch die Mutationen gestört zu sein. Die betroffenen Kanäle sind während der Plateauphase nicht vollständig inaktiviert, sondern öffnen sich und erzeugen einen kleinen depolarisierenden Strom, der zu einer Verlängerung des QT-Intervalls führt („gain of function“) (Wang et al., 1995).

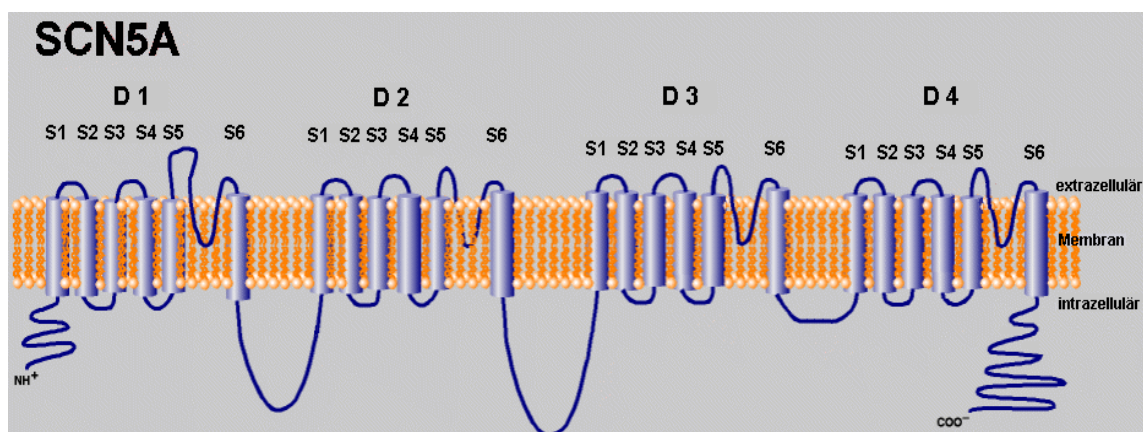


Abbildung 5: Schematische Darstellung der räumlichen Struktur des myokardialen Natriumkanals I_{Na} mit Bezeichnung des kodierenden Gens (nach L.A. Larsen, LQTS Database, http://www.ssi.dk/graphics/html/lqtsdb/scn_lg.htm).

1.3.4 Klinisches Erscheinungsbild des LQTS

1.3.4.1 EKG-Veränderungen

Die dominierenden klinischen Symptome des LQTS sind das verlängerte QT-Intervall im Standard-Elektrokardiogramm (EKG) und das Auftreten von Synkopen. Das Ausmaß der QT-Intervall-Verlängerung ist jedoch außerordentlich variabel und daher mit der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von synkopalen Episoden nicht eng korreliert (Moss, 1993). Zur frequenzabhängigen Korrektur der QT-Zeit (QT_c) im EKG wird nach klinischem Standard üblicherweise die Formel nach Bazett verwendet (Bazett, 1920). Als verlängerte QT_c -Zeiten gelten Werte über 450 ms für Männer und über 460 ms für Frauen (Schwartz et al., 1993). Ab einer QT_c -Zeit über 450 ms bzw. über 460 ms beträgt die positive prädiktive Übereinstimmung mit einem Mutationsnachweis in den LQTS-Kandidatengenen für Männer 91 % und für Frauen 96 % (Vincent et al., 1992; Garson, 1993). Frauen weisen eine durchschnittlich längere QT_c -Zeit als Männer auf, woraus sich die geschlechtsabhängigen Grenzwerte erklären (Merri et al., 1989). Diese Unterschiede lassen sich im Wesentlichen auf die hormonell gesteuerte Genexpression myokardialer Ionenkanäle zurückführen (Pham und Rosen, 2002). Zirka 20 % der genetisch Betroffenen weisen eine normale QT_c -Zeit auf (Priori et al., 2003). Hiervon auszunehmen sind Neugeborene und Säuglinge bis zum 6. Lebensmonat, bei denen gelegentlich QT_c -Werte von bis zu 500 ms vorkommen, die sich jedoch ohne zwischenzeitliches Auftreten von Tachykardien zurückbilden können (Villain et al., 1992). Andererseits scheint ein verlängertes QT-Intervall mit dem plötzlichen Kindstod assoziiert zu sein und gilt als wichtiger Risikofaktor (Schwartz et al., 1998).

Bei LQTS-Patienten bestehen spezifische Unterschiede bei den einzelnen Unterformen des LQTS hinsichtlich der QT_c -Zeiten zwischen Kindern (<16. Lebensjahr) und Erwachsenen (Zareba et al., 2003a). Die QT_c -Zeiten bei Kindern mit LQT1 sind länger als bei Erwachsenen mit LQT1, unabhängig vom Geschlecht. Bei Männern mit LQT2 sind keine altersbezogenen Unterschiede der QT_c -Zeit zu beobachten. Bei Frauen mit LQT2 oder LQT3 sind die QT_c -Zeiten in der Kindheit kürzer als im Erwachsenenalter. Weitere elektrokardiographische Befunde beim kongenitalen LQTS sind ausgeprägte QT-Dispersionen (>100 ms), bestimmt durch die Differenz zwischen dem längsten und kürzesten QT-Intervall im 12-Kanal EKG, charakteristische T-Wellenmorphologien und T-Wellen Alternationen.

Zu den typischen T-Wellenmorphologien beim LQTS gehören gekerbte und biphasische T-Wellen (Malfatto et al., 1994). Unterschiede in der T-Wellenmorphologie, die auf einen LQTS-Genotyp hinweisen können, wurden von Moss et al. (1995) identifiziert. Bei Patienten mit Mutationen im Gen KCNQ1 treten in der Regel T-Wellen mit breiter Basis und im Vergleich zu LQT2- und LQT3-Patienten längeren frequenzkorrigierten T-Wellenlänge im EKG auf. Patienten mit Mutationen im Gen KCNH2 weisen im Gegensatz zu LQT1- und LQT3-Patienten meist T-Wellen mit geringer Amplitude und biphasischem Verlauf auf. Mutationen im Gen SCN5A resultieren typischerweise in „Late-onset“-T-Wellen mit einer deutlich längeren QT_{onset} -Zeit als Mutationen in den Genen KCNQ1 und KCNH2.

T-Wellen-Alternationen, das heißt ein spontaner reversibler Wechsel der T-Wellen-Polarität, können dem Auftreten von ventrikulären Tachyarrhythmien zeitlich kurz vorausgehen (Day et al., 1990).

1.3.4.2 Torsades de Pointes - Tachykardien

Typischerweise treten beim LQTS ventrikuläre Tachykardien vom Typ Torsades de Pointes (TdP) auf. Diese Tachykardien sind eine Sonderform polymorpher Kammertachykardien. Die Bezeichnung stammt von der charakteristischen Morphologie, einer um die isoelektrische Linie undulierenden Amplitude mit periodischem Wechsel des Lagetyps, und heißt soviel wie „Schwingen bzw. Drehen der Punkte“ (Dessertenne, 1966). Eine Verlängerung des kardialen Aktionspotentials beim angeborenen LQTS kann durch die Zunahme der depolarisierenden Natriumströme („gain of function“) oder durch die Abnahme der repolarisierenden Kaliumströme I_{Kr} und I_{Ks} („loss of function“) entstehen. Mit zunehmender Länge des Aktionspotentials und zunehmender räumlicher und zeitlicher Heterogenität der Repolarisation im ventrikulären Myokard nehmen auch die elektrische Instabilität und damit die Neigung zu Rhythmusstörungen zu (Chiang und Roden, 2000). Eine verlängerte Repolarisation prädisponiert für frühe Nachdepolarisationen, die als möglicher Trigger für die Entstehung von Tachyarrhythmien vom Typ Torsades de Pointes anzusehen sind (Antzelevitch und Sicouri, 1995). Diese Tachykardien sind in der Regel selbstterminierend und können kardiale Synkopen verursachen. In einigen Fällen degenerieren diese Tachykardien aber in Kammerflimmern und können so zum plötzlichen Herztod führen (Übersicht in Benhorin und Medina, 1997).

1.3.4.3 Synkopen

Die Synkopen beim LQTS treten oftmals bei sonst völligem Wohlbefinden nach körperlicher Belastung, psychischem Stress (z.B. Erschrecken, Telefonläuten, Weckerläuten) oder im Schlaf auf. Als Prodromi wurden Schwindelzustände und Übelkeit beschrieben. Sekundär können als Folge der Minderdurchblutung des Gehirns zerebrale Krampfanfälle auftreten, die nicht selten als Ursache der Synkope fehlgedeutet werden (Ward, 1964). Große Unterschiede zwischen den einzelnen Unterformen bestehen in den Bedingungen (Trigger), die Symptome auslösen können. Diese Trigger scheinen relativ spezifisch für die einzelnen Genotypen zu sein. Schwartz et al. (2001) konnten nachweisen, dass bei LQT1-Patienten 62 % der kardialen Ereignisse während sportlicher Aktivitäten und nur 3 % während des Schlafens auftraten. LQT2-Patienten wiesen hingegen 43 % ihrer kardialen Ereignisse während emotionaler Erregung wie Angst und Ärger auf und 29 % im Schlaf. LQT3-Patienten hatten 39 % ihrer kardialen Ereignisse während des Schlafens, 19 % während emotionaler Erregung und nur 13 % während sportlicher Aktivitäten. Schwimmen konnte als relativ spezifischer Trigger für LQT1-Patienten und auditive Stimuli, wie laute Geräusche, für LQT2-Patienten identifiziert werden (Ackerman et al., 1999; Schwartz et al., 2001; Choi et al., 2004).

1.3.4.4 Erstmanifestation

Die klinische Erstmanifestation des LQTS liegt häufig im Kindes- oder Jugendalter. In einer großen Studie von Zareba et al. (2003b) lag die Wahrscheinlichkeit für ein erstes kardiales Ereignis ohne β -Blocker-Therapie vor dem 15. Lebensjahr beim LQT1 bei 50 %, beim LQT2 bei 30 % und beim LQT3 bei 7 %. Das Geschlechtsverhältnis symptomatischer weiblicher zu männlicher Patienten betrug 1,6 zu 1. In der Kindheit war der Anteil symptomatischer männlicher LQTS-Patienten höher und in der Adoleszenz der Anteil symptomatischer weiblicher LQTS-Patienten.

1.3.5 Diagnostik und Risikostratifizierung beim LQTS

Eine korrekte Diagnosestellung ist durch das breite Spektrum der klinischen Auffälligkeiten und das Vorkommen von normalen und grenzwertig verlängerten QTc-Zeiten erschwert. Trotz der zunehmenden Kenntnisse über die molekulargenetischen und elektrophysiologischen Ursachen erfolgt die Diagnostik in der Regel auf Grundlage der klinischen Symptome, der EKG-Auffälligkeiten und der Familienanamnese. Aus den Ergebnissen eines großen internationalen Registers mit langjähriger Beobachtungszeit bei Erwachsenen entwickelten Schwartz et al. (1993) einen diagnostischen Punkte-Index (Score). In diesem Schwartz-Score sind zehn diagnostische Kriterien gewichtet, unterteilt nach EKG-Veränderungen, klinischer Vorgeschichte und Familienanamnese. Zu den EKG-Veränderungen zählen dabei QT_c-Zeiten größer 450 ms bei Männern und 460 ms bei Frauen, sowie das Auftreten von Torsades de Pointes - Tachykardien, T-Wellen-Alternationen und gehöckerten T-Wellen. Zur klinischen Vorgeschichte werden Synkopen während Stresszuständen oder in Ruhe und das Vorliegen einer angeborenen Taubheit gewertet. Die Familienanamnese umfasst verwandte LQTS-Patienten und ungeklärte Todesfälle vor dem 30. Lebensjahr. Für den Diagnostik-Score nach Schwartz sind Sensitivität und Spezifität ebenso wenig wie positiv- oder negativ-prädiktiver Wert bisher prospektiv erhoben worden.

Bei klinisch überzeugender Evidenz für das Vorliegen eines LQTS kann heute zur Diagnosesicherung die genetische Diagnostik empfohlen werden. Mit einer Treffsicherheit von zirka 70 - 80 % findet sich eine Mutation in den LQTS-Genen KCNQ1, KCNH2 und SCN5A. Routinemäßige molekulargenetische Untersuchungen für alle Patienten mit Verdacht auf ein LQTS sind bislang jedoch weder etabliert noch existieren einheitliche Richtlinien zur genetischen Diagnostik bei LQTS. Empfohlen wird die gezielte Untersuchung weiterhin für Familienangehörige von Patienten, bei denen eine Mutation nachgewiesen wurde (Chiang und Roden, 2000).

Informationen über das Auftreten kardialer Ereignisse, wie Synkopen oder Kammerflimmern, sind nicht nur für die Diagnosestellung entscheidend, sondern beeinflussen auch die weitere Therapie der betroffenen Patienten und ermöglichen ein individuelles Abschätzen des Risikos dieser Patienten für kardiale Ereignisse. Dies trifft insbesondere auf solche Patienten zu, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung asymptomatisch sind und bisher nicht behandelt wurden. Umfassende Risikostratifizierungen beim LQTS wurden in den Studien von Priori et al. (2003) und Zareba et al. (2003a) versucht. Bei der Analyse der einzelnen Subgruppen zeigte sich für Patienten mit LQT1 kein Einfluss des Geschlechtes auf das Risiko eines ersten

kardialen Ereignisses vor dem 40. Lebensjahr und vor einer Therapie. Frauen mit LQT2 hatten ein höheres Risiko und mit LQT3 ein geringeres Risiko als Männer. In jeder Subgruppe war die QT_c-Zeit bei Patienten mit kardialen Ereignissen signifikant länger als bei den asymptomatischen Patienten. Der Anteil der Patienten, die eine Mutation trugen aber normale QT_c-Zeiten aufwiesen, war beim LQT1 (36 %) signifikant größer als beim LQT2 (19 %) und beim LQT3 (10 %). Die jährliche Inzidenz für das Auftreten eines plötzlichen Herztodes oder einer letalen Arrhythmie betrug ohne Therapie vor dem 40. Lebensjahr beim LQT1 0,3 %, beim LQT2 0,6 % und beim LQT3 0,56 %. Die Resultate der Studien zeigten, dass sowohl die QT_c-Zeit als auch die Lokalisation der Mutation aber nicht das Geschlecht unabhängige Prädiktoren für ein erstes kardiales Ereignis darstellen. Ein hohes Risiko (≥ 50 %) für ein erstes kardiales Ereignis vor dem 40. Lebensjahr ohne Therapie besteht daher bei einer QT_c-Zeit ≥ 500 msec für alle Patienten mit einem LQT1 oder LQT2 sowie für männliche Patienten mit einem LQT3. Ein mittleres Risiko (30 – 49 %) besteht bei einer QT_c-Zeit < 500 msec für weibliche Patienten mit einem LQT2, bei allen Patienten mit einem LQT3 sowie bei weiblichen Patienten mit einem LQT3 und einer QT_c-Zeit ≥ 500 msec. Ein geringes Risiko (< 30 %) besteht bei einer QT_c-Zeit < 500 msec für alle Patienten mit LQT1 und für männliche Patienten mit LQT2 (Priori et al., 2003).

1.3.6 Prognose und Therapie des LQTS

Bei unbehandelten symptomatischen Patienten mit LQTS besteht eine hohe Letalität. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines plötzlichen Herztodes beträgt nach einem Jahr bis zu 10 % und nach 10 Jahren bis zu 50 % (Schwartz, 1985). Der größte Anteil tödlich verlaufender kardialer Ereignisse findet sich beim LQT3. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten klinischer Symptome vor dem 40. Lebensjahr beträgt beim LQT1 63 %, beim LQT2 46 % und beim LQT3 18 % (Zareba et al., 1998). Eine optimale Therapie kann die Mortalität auf unter 8 % in 5 Jahren reduzieren (Zareba et al., 1998). Die medikamentöse Therapie mit β -Blockern und eine Verhaltensadaptation stellen dabei die Basistherapie dar. In Studien konnte durch eine β -Blocker-Therapie zwar keine signifikante Verkürzung des QT_c-Wertes, aber eine Abnahme der QT-Dispersion beobachtet werden (Priori et al., 1994). Zwischen den einzelnen β -Blocker-Präparaten und den verschiedenen Dosierungen scheinen keine Wirkungsunterschiede zu bestehen (Moss et al., 2000). Als Verhaltensadaptation sollten die betroffenen Patienten die Trigger für die entsprechenden klinischen Subtypen des LQTS und alle QT-verlängernden Medikamente sowie Hypokaliämien

und Hypomagnesiämien vermeiden (Moss et al., 2000; Priori et al., 2001). Alle LQTS-Patienten, vor allem LQT1-Patienten, sollten aufgrund der Häufung von Synkopen während Anstrengung keinen Wettkampfsport betreiben (Schwartz et al., 2001). Bei Patienten mit symptomatischen Bradykardien, ausgeprägten Sinusbradykardien oder AV-Blockierung besteht zusätzlich die Indikation zur Schrittmacherimplantation (Dorostkar et al., 1999; Viskin, 2000). Bei therapieresistentem LQTS und bei überlebtem plötzlichen Herztod wird die Implantation eines intrakardialen Defibrillators (ICD) befürwortet (Priori et al., 2001). Allerdings wurde bisher in keiner randomisierten Studie die lebensverlängernde Wirkung der ICD-Therapie nachgewiesen. Für Patienten mit rezidivierenden Synkopen unter β -Blocker-Therapie und für Patienten mit wiederholten Arrhythmien unter ICD-Therapie wird eine linksseitige kardiale Sympathektomie (LCSD) empfohlen. Dabei wird das linke Ganglion stellatum durch einen zervikothorakalen Eingriff entfernt. Grundlage dieser Therapieform ist die Theorie, dass eine erhöhte sympathische Aktivität am Herzen eine triggernde Rolle in der Genese von ventrikulären Tachyarrhythmien spielt, sowie die Beobachtung, dass eine LCSD-Therapie signifikant das Auftreten kardialer Ereignisse und Synkopen bei Hochrisiko-Patienten reduziert (Schwartz et al., 2004).

Erste Erfolge von genspezifischen pharmakologischen Therapieformen konnten zwar in einzelnen Untersuchungen gezeigt werden, jedoch existieren aufgrund der bisher unzureichenden Evidenz noch keine einheitlichen Therapierichtlinien. Bei LQT1-Patienten konnte für die medikamentöse Therapie mit β -Blockern eine bessere Effektivität als bei LQT2- und LQT3-Patienten nachgewiesen werden (Zareba et al., 2003; Priori et al., 2004b). Eine mögliche Erklärung besteht in der Fehlfunktion des Kanals I_{Ks} bei LQT1-Patienten. Die mutationsbedingte Funktionseinschränkung von I_{Ks} bei diesen Patienten kann bei schnellen Herzfrequenzen zu einer inadäquaten Verkürzung der ventrikulären Repolarisation führen (vergleiche Kapitel 1.3.3.1). Für LQT2-Patienten wurde in Studien der protektive Effekt einer längerfristigen Kaliumsubstitution gezeigt. Aufgrund der möglichen Nebenwirkungen und den Schwierigkeiten einer langfristigen oralen Therapie wird die prophylaktische Kaliumsubstitution bei LQTS jedoch nicht generell empfohlen (Etheridge et al., 2003). Eine der ersten Studien genspezifischer Therapieformen zeigte, dass bei LQT3-Patienten unter einer medikamentösen Therapie mit Natriumkanal-Blocker wie Mexiletine das QT-Intervall deutlich stärker verkürzt wird als bei LQT1- und LQT2-Patienten (Schwartz et al., 1995). Durch zukünftige systematische Untersuchungen vor allem zur Phänotyp-Genotyp-Korrelation besteht die Hoffnung auf eine effektivere Risikostratifizierung und möglicherweise auf weitere genotypspezifische Therapieansätze.

1.4 Das Brugada-Syndrom

1.4.1 Einleitung

Das Brugada-Syndrom gehört wie das Long-QT-Syndrom zu den Ionenkanalerkrankungen und wurde in umfassender Form erstmals 1992 von den Brüdern Pedro und Josep Brugada beschrieben (Brugada und Brugada, 1992). Sie nannten diese neue medizinische Entität zunächst „Syndrom mit Rechtsschenkelblock, ST-Strecken-Hebung und plötzlichem Herztod“. Bisher wurden bei circa 20 % der betroffenen Patienten Mutationen im Gen SCN5A identifiziert, welches auch bei der Form LQT3 des Long-QT-Syndroms betroffen ist und die Alpha-Untereinheit des myokardialen Natriumkanals kodiert (Chen et al., 1998; Smits et al., 2002). Über die Häufigkeit der Erkrankung liegen nur wenige Daten vor. Schätzungen gehen davon aus, dass die Inzidenz zwischen 5 und 66 von 10.000 beträgt und zirka 40 - 60 % der Patienten mit idiopathischem Kammerflimmern von einem Brugada-Syndrom betroffen sind (Wilde et al., 2002). Eine höhere Inzidenz wird für die Länder Südostasiens angenommen. Dort zählt das Brugada-Syndrom zu den häufigsten Ursachen eines plötzlichen Herztodes vor dem 50. Lebensjahr (Brugada et al., 2005). Bei mehr als 90 % aller beschriebenen Fälle handelte es sich um Männer (Alings und Wilde, 1999).

1.4.2 Ätiologie des Brugada-Syndroms

Das Brugada-Syndrom wird allgemein als eine angeborene Erkrankung mit autosomal dominantem Erbgang charakterisiert (Antzelevitch et al., 2002). Untersuchungen zu den genetischen Grundlagen der Erkrankung wurden erstmals von Chen et al. (1998) publiziert. In dieser Studie wurden bei Patienten mit Brugada-Syndrom Mutationen im Gen SCN5A identifiziert. Dieses Gen kodiert die porenbildende α -Untereinheit des myokardialen Natriumkanals I_{Na} und ist auf dem Chromosom 3p21-24 lokalisiert (siehe auch Kapitel 1.3.3.2). Bisher gilt SCN5A als einziges Krankheitsgen für das Brugada-Syndrom. Bei circa 80 % der Patienten mit Brugada-Syndrom lässt sich bislang keine genetische Ursache finden (Grant, 2001; Smits et al., 2002).

1.4.3 Pathophysiologie des Brugada-Syndroms

Ein mittlerweile etablierter Pathomechanismus des Brugada-Syndroms, der die charakteristischen EKG-Veränderungen erklärt, basiert auf den transmuralen Unterschieden in der Morphologie des kardialen Aktionspotentials (Yan und Antzelevitch, 1996; Antzelevitch, 1998). Diese Unterschiede werden vor allem durch eine stärkere Expression des transienten Kalium-Auswärtsstroms I_{to} in den epikardialen Schichten als in den endokardialen Schichten verursacht (Näbauer und Beuckelmann, 1996). Das Aktionspotential im Epikard zeigt dadurch im Vergleich zum Endokard eine „Spike-and-dome“ Morphologie und zeichnet sich durch eine Kerbe in der frühen Repolarisationsphase aus. Am Ende der frühen Repolarisationsphase des Aktionspotentials besteht ein balanciertes Gleichgewicht zwischen dem Kalium-Auswärtsstrom I_{to} und dem Natrium-Einwärtsstrom I_{Na} . Expressionsstudien mit identifizierten Mutationen von Patienten mit Brugada-Syndrom konnten sowohl eine fehlende Expression der Natriumkanäle als auch eine herabgesetzte Funktion mutierter Natriumkanäle im Vergleich zum Wildtyp nachweisen („loss of function“) (Antzelevitch, 2001; Baroudi et al., 2002). Durch diese pathophysiologischen Eigenschaften unterscheiden sich die Mutationen im myokardialen Natriumkanal-Gen der Patienten mit Brugada-Syndrom von denen mit LQTS („gain of function“) (Balser, 1999). Der verringerte Natrium-Einwärtsstrom, resultierend aus der mutationsbedingten Funktionseinschränkung der Natriumkanäle beim Brugada-Syndrom, kann das Gleichgewicht in der Phase der frühen Repolarisation stören und zu einem Abbruch des Aktionspotentials in den Zellen des Epikards führen. Dadurch entsteht ein Spannungsgradient über dem Myokard, der elektrokardiographisch in ST-Strecken-Hebungen resultiert (Bezzina et al., 2001). Die typische Prominenz der ST-Strecken-Hebungen in den rechtspräkordialen Ableitungen beim Brugada-Syndrom lässt sich dadurch erklären, dass in den epikardialen Zellen des rechten Ventrikels ein größerer transienter Kalium-Auswärtsstroms I_{to} nachgewiesen wurde als in denen des linken Ventrikels (Alings und Wilde, 1999).

Der beschriebene Pathomechanismus kann räumlich sehr heterogen verlaufen und in Zellschichten mit verkürztem Aktionspotential neben Zellschichten mit normalem Aktionspotential resultieren. Dadurch sind die Voraussetzungen für die Entstehung von Reentry-Mechanismen mit resultierenden ventrikulären Tachykardien gegeben (Roden, 2002).

1.4.4 Klinisches Erscheinungsbild des Brugada-Syndroms

Die typischen klinischen Symptome des Brugada-Syndroms bestehen im Auftreten von kardialen Synkopen und dem plötzlichen Herztod infolge von Kammerflimmern (Wilde et al., 2002). Bei den untersuchten Patienten besteht in der Regel kein Hinweis auf das Vorliegen einer bedeutsamen strukturellen Herzerkrankung (Brugada und Brugada, 1992). Die rezidivierenden kardialen Synkopen werden vermutlich durch selbstterminierende Episoden von polymorphen ventrikulären Tachykardien hervorgerufen (Priori et al., 2000a). Diese polymorphen ventrikulären Tachykardien können wie beim LQTS in Kammerflimmern degenerieren. Die Fälle von plötzlichem Herztod traten vor allem nachts und in den frühen Morgenstunden auf (Matsuo et al., 1999).

Zu den charakteristischen elektrokardiographischen Befunden gehören ST-Strecken-Hebungen in den rechts präkordialen Ableitungen V1-V3. Diese ST-Strecken-Hebungen treten ohne Nachweis von strukturellen Herzerkrankungen auf und werden in drei Typen unterteilt (Wilde et al., 2002). Typ 1 ist charakterisiert durch eine gewölbte ST-Segment-Konfiguration $\geq 0,2$ mV, zum Teil hervorgerufen durch eine zusätzliche J-Welle, gefolgt von einer negativen T-Welle. Typ 2 zeigt eine sattelförmige ST-Segment-Konfiguration und eine deutliche ST-Strecken-Hebungen ($\geq 0,2$ mV). Die zusätzliche J-Welle ruft bei diesem Typ einen langsamen Abfall der ST-Segment-Erhöhung hervor, gefolgt von einer positiven oder biphasischen T-Welle. Beim Typ 3 ist die ST-Segment-Konfiguration sattelförmig wie bei Typ 2 oder gewölbt wie bei Typ 1 und die ST-Strecken-Hebungen geringer als bei den anderen beiden Typen ($< 0,1$ mV). Andere EKG-Charakteristika sind sehr eng gekoppelte Extrasystolen, schnelle polymorphe ventrikuläre Tachykardien und eine Rechtsschenkelblock ähnliche QRS-Morphologie (Brugada und Brugada, 1997; Antzelevitch et al., 2002). Bisher existieren allerdings keine Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Ausprägung der EKG-Veränderungen und dem Risiko für einen plötzlichen Herztod belegen. Die Dauer des QT-Intervalls ist in der Regel normal, kann aber auch verlängert sein (Wilde et al., 2002). Smits et al. (2002) konnten in einer retrospektiven Studie zeigen, dass sich Brugada-Syndrom Patienten mit einer Mutation im Gen SCN5A von solchen ohne Mutation bezüglich spezifischen EKG-Veränderungen unterscheiden.

1.4.5 Diagnostik und Risikostratifizierung des Brugada-Syndroms

Laut den Empfehlungen der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (Wilde et al., 2002; Antzelevitch et al., 2005) sollte die Diagnose Brugada-Syndrom in folgenden Fällen gestellt werden: Nachweis des Hauptkriteriums - spontane oder durch Natriumkanal-Blocker provozierte ST-Strecken-Hebungen vom Typ 1 (gewölbter Typ) $\geq 0,2$ mV in mehr als einer rechtspräkordialen Ableitung - und zusätzlicher Nachweis von einem der folgenden Nebenkriterien: dokumentiertes Kammerflimmern, Dokumentation von selbst terminierenden polymorphen Kammertachykardien, eine Familienanamnese mit einem plötzlichen Herztod vor dem 45. Lebensjahr, Nachweis von ST-Segment-Erhöhungen im EKG bei mindestens einem Familienmitglied, elektrophysiologische Induzierbarkeit und Synkopen in der Vorgeschichte. Als Hauptkriterium werden neben dem Nachweis von Typ 1-ST-Strecken-Hebungen auch ST-Strecken-Hebungen vom Typ 2 oder 3 mit Konversion zum Typ 1 durch Gabe von Natriumkanal-Blockern gewertet.

Molekulargenetische Untersuchungen sind aufgrund des hohen Anteils negativer genetischer Befunde bei symptomatischen Patienten bislang nicht etabliert. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass ein genetischer Defekt im SCN5A Gen nicht mit einem erhöhten Risiko für kardiale Ereignisse assoziiert ist (Priori et al., 2002). Zur Demaskierung der typischen EKG-Befunde beim Brugada-Syndrom findet der Provokationstest mit Natriumkanal-Blockern, wie Ajmalin und Flecainid, Anwendung. So können die spezifischen EKG-Veränderungen auch bei bislang asymptomatischen Patienten mit einem Brugada-Syndrom nachgewiesen werden (Brugada et al., 2000). Nach der Gabe von Natriumkanal-Blockern zeigen Träger von Mutationen im EKG signifikant längere PQ-Zeiten und QRS-Intervalle (Smits et al., 2002). Aufgrund der bisher fehlenden prospektiven Validierung und der möglichen Nebenwirkungen des Testes, wie ventrikuläre Tachykardien, existieren aktuell weder Empfehlungen zur routinemäßigen Verwendung des medikamentösen Provokationstests noch standardisierte Protokolle. Zudem zeigten verschiedene Studien unterschiedliche Werte für Sensitivität und Spezifität (Brugada et al., 2000; Priori et al., 2000b). Bei symptomatischen Patienten wird von einigen Autoren zur Diagnosesicherung und Risikostratifizierung eine elektrophysiologische Untersuchung empfohlen (Wilde et al., 2002; Antzelevitch et al., 2005). Die Bedeutung der Induzierbarkeit von reproduzierbaren polymorphen Kammertachykardien oder Kammerflimmern während einer elektrophysiologischen Untersuchung wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert (Priori et al., 2002; Brugada et al., 2003).

In einer retrospektiven Studie untersuchten Priori et al. (2002) die unterschiedlichen Diagnoseparameter als Prediktoren für einen plötzlichen Herztod und entwickelten ein Schema für die Risiko-Stratifizierung von Patienten mit Brugada-Syndrom. Die Studienergebnisse zeigten, dass nur der Nachweis von ST-Streckenhebungen im EKG in Verbindung mit Synkopen in der Vorgeschichte des Patienten als positiver Prediktor für einen plötzlichen Herztod gewertet werden kann. Ein hohes Risiko für das Auftreten eines plötzlichen Herztodes besteht für Patienten mit Synkopen in der Vorgeschichte sowie spontanen ST-Streckenhebungen im EKG (10 % der untersuchten Patienten). Ein mittleres Risiko haben Patienten ohne Synkopen, aber mit spontanen ST-Streckenhebungen im EKG (41 % der untersuchten Patienten). Patienten mit unauffälligem EKG (49 % der untersuchten Patienten) weisen unabhängig vom Vorhandensein einer Synkope in der Vorgeschichte ein geringes Risiko für den plötzlichen Herztod auf (Priori et al., 2002). Andere Autoren konnten zudem nachweisen, dass Männer mit Brugada-Syndrom ein fünffach höheres Risiko als Frauen mit Brugada-Syndrom tragen und familiäre Formen im Vergleich zu sporadischen Fällen kein erhöhtes Risiko darstellen (Brugada et al., 2003).

1.4.6 Prognose und Therapie des Brugada-Syndroms

Über die Prognose und die Therapierichtlinien des Brugada-Syndroms liegen aufgrund der Seltenheit der Erkrankung in der Regel nur retrospektive Analysen mit wenigen Fallzahlen vor. Die Mortalität von unbehandelten symptomatischen Patienten mit Brugada-Syndrom wird mit 31 % in den ersten drei Jahren angegeben (Grant, 2001). Die Rezidivrate für lebensbedrohliche ventrikuläre Arrhythmien bei reanimierten Patienten liegt nach 4½ Jahren bei 69 %. Für asymptomatische Patienten mit typischen EKG-Veränderungen zeigen Studien mit einem Beobachtungszeitraum von 3 - 4 Jahren eine Wahrscheinlichkeit für kardiale Ereignisse zwischen 0,8 % und 8 % (Brugada et al., 2002; Eckardt et al., 2005).

Aufgrund der hohen Rezidivgefahr wird für Patienten mit einem überlebten Herzstillstand die Implantation eines intrakardialen Defibrillators empfohlen (Brugada et al., 2003). Auch für Patienten mit nachgewiesenen ST-Strecken-Hebungen vom Typ 1 im EKG und rezidivierenden Synkopen in der Vorgeschichte gilt die Empfehlung zur Defibrillator-Implantation, da diese Patienten ein hohes Risiko für einen plötzlichen Herztod aufweisen (Priori et al., 2002). Für alle anderen Patienten existiert derzeit kein einheitliches Vorgehen bezüglich einer Therapie. Grundsätzlich sollte diese Patientengruppe daher auslösende Trigger für das Brugada-Syndrom, wie Zustände

mit erhöhter Körpertemperatur, Hyper- und Hypokaliämien und die Einnahme von Klasse I - Antiarrhythmika und Psychopharmaka vermeiden. Zusätzlich werden engmaschige klinische Kontrollen mit regelmäßigen Ableitungen von Langzeit-Elektrokardiogrammen empfohlen (Brugada et al., 2003).

Antiarrhythmika (inklusive Amiodaron) und Beta-Rezeptorenblocker haben sich bei der Behandlung von Brugada-Patienten als nicht ausreichend effektiv, beziehungsweise als pro-arrhythmogen erwiesen (Chen et al., 1998). Eine Ausnahme gilt für Chinidin, welches als zusätzliches Medikament bei der Therapie der Hochrisiko-Gruppe empfohlen werden kann (Napolitano und Priori, 2006). Chinidin blockiert als Klasse I - Antiarrhythmikum nicht nur den Natriumkanal sondern auch den Kaliumkanal I_{to} und kann somit das Gleichgewicht in der Phase der frühen Repolarisation wieder herstellen und den Abbruch des Aktionspotentials in den epikardialen Zellen verhindern (siehe Seite 19).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Long-QT-Syndrom und das Brugada-Syndrom stellen familiäre Arrhythmiesyndrome mit hohem Risiko für einen plötzlichen Herztod dar. Sie zeigen ein sehr heterogenes klinisches Erscheinungsbild in Bezug auf auslösende Faktoren, EKG-Veränderungen und Schwere der kardialen Ereignisse. Beim Brugada-Syndrom ist bislang nur ein Krankheitsgen bekannt, welches bei zirka 20 % der Betroffenen eine ursächliche Mutation aufweist. Als molekulare Ursachen des LQTS wurden bislang Mutationen auf sieben verschiedenen Genen identifiziert. Bei zirka 70 % der Patienten mit LQTS gelingt es eine ursächliche Mutation auf einem der drei häufigsten Krankheitsgene nachzuweisen. Obwohl bisher eine Vielzahl von Mutationen beim LQTS und Brugada-Syndrom identifiziert wurden, sind nur wenige funktionell charakterisiert worden. Große Studien zur Genotyp-Phänotyp Korrelation dieser beiden Erkrankungen basierten bisher auf retrospektiven klinischen Untersuchungen und der Lokalisation nachgewiesener Mutationen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des Zusammenhangs zwischen den klinischen Symptomen beim LQTS und dem Brugada-Syndrom, den verschiedenen Arten und Lokalisationen von Mutationen und ihren Auswirkungen auf die Kanaleigenschaften. Durch die funktionelle Expression identifizierter Mutationen in einem geeigneten Zellmodell und die elektrophysiologische Charakterisierung dieser Mutationen sollte exemplarisch ein Ansatz für eine systematische Korrelation von Genotyp und Phänotyp versucht werden.

Folgende Fragen versuchte die vorliegende Arbeit im Besonderen zu beantworten:

1. Kann bei den vier untersuchten Patienten eine Diagnose für das Long-QT-Syndrom bzw. das Brugada-Syndrom an Hand der klinischen Charakterisierung entsprechend den aktuellen Empfehlungen aus der Literatur gestellt werden, und stimmt die klinische Diagnose mit der molekulargenetischen Untersuchung überein?
2. Korrelieren die klinischen Charakteristika der Patienten mit den elektrophysiologischen Untersuchungsergebnissen der funktionell expremierten Mutationen?
3. Lässt sich eine Korrelation von Genotyp und Phänotyp nachweisen?
4. Welche Empfehlungen zur systematischen Untersuchung einer Genotyp-Phänotyp Korrelation für das LQTS und das Brugada-Syndrom ergeben sich daraus?

2 Patienten, Methoden und Materialien

2.1 Methoden zur phänotypischen Charakterisierung

2.1.1 Patientengruppe

Es wurden vier Patienten mit überlebtem plötzlichem Herztod (Indexpatienten) phänotypisch und genotypisch charakterisiert. Alle vier Indexpatienten konnten bei plötzlich aufgetretenem Herz-Kreislaufstillstand erfolgreich reanimiert werden. Außer den vier Indexpatienten wurden auch die jeweiligen Familienangehörigen untersucht. In die Diagnostik wurden die Eltern, die Geschwister und die Kinder der Indexpatienten einbezogen, soweit die Einwilligungen vorlagen. Dabei erfolgte jeweils eine klinische Anamnese, die Ableitung eines Elektrokardiogramms in Ruhe und eine molekulargenetische Zieldiagnostik in Hinblick auf die identifizierte Mutation des verwandten Indexpatienten.

2.1.2 EKG-Auswertung

Bei allen vier Indexpatienten und den verfügbaren Familienangehörigen wurden 12-Kanal-Elektrokardiogramme in Ruhe mit einer Papiergeschwindigkeit von 25 mm/sec, bzw. 50 mm/sec und einer Eichzackenhöhe von 10 mm/mV abgeleitet. Die Auswertung bei allen Patienten erfolgte hinsichtlich Rhythmus, Herzfrequenz, Herzzeiten, Blockbildung, Hypertrophiezeichen, Erregungsausbreitung und -rückbildung. Die Zeiten wurden nach internationalen Festlegungen in der Extremitätenableitung II gemessen (Benhorin et al., 1990). Für die Ermittlung der jeweiligen QT_c-Zeit wurde zunächst das kürzeste RR-Intervall bestimmt und dann die folgende QT-Strecke gemessen (Garson, 1993). Für die Berechnung der frequenzkorrigierten QT-Zeit (QT_c) fand die Korrekturformel von Bazett (1920) Anwendung: $QT_c = QT / \sqrt{RR}$. Zusätzlich erfolgte die Dokumentation von LQTS-spezifischen morphologischen Veränderungen der T-Welle, sowie die Messung der frequenzkorrigierten T-Wellenlänge (T_{Wellenlänge-c}), der T-Wellenamplitude, der frequenzkorrigierten QT_{onset}-Zeit (QT_{onset-c}) und der frequenzkorrigierten QT_{peak}-Zeit (QT_{peak-c}). Die QT_{onset}-Zeit wird definiert durch das Zeitintervall zwischen Q-Zacke und Beginn der T-Welle und die QT_{peak}-Zeit durch das Zeitintervall zwischen Q-Zacke und der positiven oder negativen Spitze der T-Welle (Moss et al., 1995).

Brugada-Syndrom-spezifische EKG-Veränderungen, wie ST-Segment-Erhöhungen und rechtsschenkelblockähnliche QRS-Morphologien, wurden ebenfalls dokumentiert.

Zur Untersuchung der QT_c-Zeitveränderungen unter Belastung bei LQT1-Patienten wurde bei dem Indexpatienten M.P. und fünf Angehörigen der Indexpatientin C.W. eine Fahrrad-Ergometrie durchgeführt. Bei der Indexpatientin C.W. konnte diese Untersuchung aufgrund der neurologischen Symptomatik nicht durchgeführt werden. Die ergometrische Untersuchung erfolgte aber bei ihren drei Schwestern und den zwei älteren Nichten unabhängig vom molekulargenetischen Untersuchungsergebnis. Während der Untersuchung wurde jeweils ein 12-Kanal-Elektrokardiogramm vor Belastung und während maximaler Belastung abgeleitet.

2.1.3. Anamneseerhebung

Von allen Indexpatienten wurde eine ausführliche Eigenanamnese erhoben, und zur Untersuchung der genauen Umstände des überlebten plötzlichen Herztodes wurden alle verfügbaren Arztbriefe und die Beobachtungen anwesender Personen ausgewertet. Dabei standen die typischen Symptome des LQTS und des Brugada-Syndroms entsprechend den aktuellen Empfehlungen zur Diagnosestellung im Vordergrund.

2.1.4. Diagnosestellung

2.1.4.1. Diagnose LQTS

Bei jedem Indexpatienten mit verlängerter QT_c-Zeit und den jeweiligen Familienmitgliedern wurde für die klinische Diagnosestellung eines LQTS der Diagnostik-Score nach Schwartz verwendet. Diese Bewertungsmethode der klinischen Symptomatik wurde 1983 von Schwartz, dem Leiter des Internationalen Long-QT-Registers, eingeführt und 1993 in Form eines Punkte-Scores zur Berechnung der individuellen Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines LQTS überarbeitet (Schwartz, 1983; Schwartz et al., 1993). Folgende Kriterien werden im Score mit Punkten bewertet:

Kriterien	Punkte
<u>EKG-Veränderungen:</u>	
A. - QT _c ≥ 480 ms	3
> 460 ms	2
> 450 ms bei männlichem Geschlecht	1
B - Torsades de Pointes - Episoden (1)	2
C - T-Wellen-Alternationen	1
D - deformierte T-Wellen in mindestens drei Ableitungen	1
E - Ruhe-Herzfrequenz unter der altersbezogenen 2. Percentile (2)	½
<u>Klinische Ereignisse:</u>	
A - Synkope bei Stress	2
- Synkope ohne Stress	1
B - kongenitale Taubheit (3)	½
<u>Familiäre Belastung:</u>	
A - diagnostiziertes LQTS in der Familie	1
B - ungeklärter Todesfall vor dem 30. Lebensjahr in der Familie	½

Erläuterungen:

(1) es werden entweder im EKG dokumentierte Torsades de Pointes - Tachykardien oder Synkopen gewertet

(2) gilt nur für Patienten unter 3 Jahren (Vincent et al., 1986)

(3) eine verlängerte QT-Zeit assoziiert mit angeborener Taubheit kann ein Hinweis für das Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom sein (Jervell und Lange-Nielsen, 1957)

Bei einer Punktesumme ≤ 1 besteht eine geringe Wahrscheinlichkeit für ein LQTS, bei einer Punktesumme von 2 bis 3 eine mittlere Wahrscheinlichkeit und bei einer Punktesumme ≥ 4 eine hohe Wahrscheinlichkeit.

2.1.4.2. Diagnose Brugada-Syndrom

Die Diagnosestellung des Brugada-Syndroms erfolgte entsprechend den aktuellen Empfehlungen der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (Wilde et al., 2002, Antzelevitch et al., 2005). Die Diagnose besteht aus:

1. Nachweis von einem der folgenden Hauptkriterien in mehr als einer rechtspräkordialen Ableitung im Ruhe-EKG: spontane oder durch Natriumkanal-Blocker provozierte ST-Strecken-Hebungen vom Typ 1 (gewölbter Typ), ST-Strecken-Hebungen vom Typ 2 (sattelförmiger Typ) oder Typ 3 mit Konversion zum Typ 1 durch Gabe von Natriumkanal-Blockern.
2. Nachweis von einem der folgenden Nebenkriterien: dokumentiertes Kammerflimmern, Dokumentation von selbst terminierenden polymorphen Kammertachykardien, eine Familienanamnese mit einem plötzlichen Herztod vor dem 45. Lebensjahr, Nachweis von ST-Strecken-Hebungen im EKG bei mindestens einem Familienmitglied, elektrophysiologische Induzierbarkeit, Synkopen in der Vorgeschichte.

2.1.5 Familienanamnese

Von jedem Indexpatienten wurde ein Stammbaum erhoben, der die Elterngeneration, die Generation des Indexpatienten mit den Geschwistern und die Generation der Kinder des Indexpatienten und die Kinder seiner Geschwister umfasste. In die Stammbaum-Graphik wurden das Vorliegen einer Symptomatik (z.B. Synkope), einer Mutation und bei allen Indexpatienten mit LQTS und ihren Familienmitgliedern die jeweilige QT_c-Zeit eingetragen. Für die Familienmitglieder der Indexpatienten mit LQTS erfolgte zusätzlich die Berechnung der individuellen Wahrscheinlichkeit für ein LQTS mit dem Diagnostik-Score nach Schwartz (1993).

2.2 Methoden zur genotypischen Charakterisierung

2.2.1 Sequenzierung

Die klinische Diagnose jedes einzelnen Indexpatienten konnte durch eine molekulargenetische Diagnostik verifiziert werden. Dazu erfolgte die Komplet-Sequenzierung der Gene KCNQ1, KCNH2, KCNE1, KCNE2 und SCN5A. Zur molekulargenetischen Untersuchung wurde den Indexpatienten und den verfügbaren Familienangehörigen eine EDTA-Blutprobe entnommen und an das Labor für medizinische Genetik Dr. Klein in Martinsried gesandt. Dort erfolgten die Isolation der genomischen DNA aus den Lymphozyten der Blutproben und die Amplifikation der Krankheitsgene für das LQTS und das Brugada-Syndrom. Anschließend wurden vorhandene Mutationen durch DNA-Sequenzanalysen und Sequenzvergleiche mit den veröffentlichten Wildtyp-Sequenzen (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) identifiziert.

Für jede identifizierte Mutation erfolgte an Hand der Datenbanken „Long-QT-Syndrome Database“ (<http://www.ssi.dk/sw13050.asp>) und „The Human Gene Mutation Database (HGMD)“ (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/hgmd0.html>) der Nachweis, ob diese in der Literatur schon beschrieben wurde und die Dokumentation bisher identifizierter benachbarter Mutationen.

2.3 Methoden zur funktionellen Charakterisierung

2.3.1 Molekularbiologische Methoden

2.3.1.1 PCR-Mutagenese

2.3.1.1.1 Overlap-Extension-PCR

2.3.1.1.1.1 PCR-Methode

Für die Mutagenese der identifizierten Mutation T322A im Gen KCNQ1 wurde die Overlap-Extension-PCR verwendet. Bei dieser Methode können durch die Fusion von Genfragmenten, in die vorher die Mutationen eingeführt wurden, einzelne Basen eines Gens gezielt ausgetauscht oder weggelassen werden. Bei der Overlap-Extension-PCR werden im Gegensatz zur Standard-PCR insgesamt vier Primer verwendet, wobei zwei komplementäre Primer die Mutation tragen und zwei weitere Primer „upstream“ und „downstream“ von dem mutagenen Primern liegen. Mit je einem mutagenen und einem äußeren Primer werden in zwei getrennten PCR-Ansätzen ein Upstream- und ein Downstream-Teilamplifikat erzeugt. Die sich überlappenden Teilamplifikate werden zusammen mit den flankierenden Primern in eine zweite PCR eingesetzt. Das PCR-Produkt enthält an der gewählten Stelle die gewünschte Mutation (Higuchi et al., 1988). Die wichtigsten Schritte zur Optimierung der PCR-Reaktion bestanden im Testen und Auswählen der geeigneten Polymerase, dem Designen der Primer und der Ermittlung ihrer optimalen Annealing-Temperatur sowie der Bestimmung der optimalen Reaktionsparameter des Thermocyclers. Zudem spielte die optimale Konzentration von $MgSO_4$ eine große Rolle, da einzelne Magnesium-Ionen mit den dNTP's, den Primern und den DNA-Templates Komplexe bilden können. Zu wenig $MgSO_4$ kann daher in einem zu geringen Ertrag an Amplifikat resultieren. Eine zu hohe Konzentration an $MgSO_4$ kann die Menge an unspezifischen PCR-Produkten erhöhen.

2.3.1.1.1.2 PCR-Primer

Zur Erzeugung der Mutation T322A im Gen KCNQ1 wurde die Overlap-Extension-PCR-Methode angewendet, für die insgesamt vier Primer benötigt werden. Durch diese PCR-Methode wird das mutierte Gen aus dem Vektor entfernt. Für die funktionelle Expression der erzeugten Mutante ist es jedoch notwendig, die Mutanten wieder in die

GFPIre-Vektoren zu ligieren. Dafür werden zwei Schnittstellen für ein Restriktionsenzym benötigt, die beide außerhalb der Gensequenz des Kanalproteins und in der Multiple-Cloning-Site (MCS) des Vektors liegen. Primer Nr. 1 ist der Forward-Primer für das erste Teilamplifikat und für das Amplifikat der Fusions-PCR. Er begrenzt die zu mutierende DNA-Sequenz am 5'-Ende, umspannt die Grenze zwischen Insert und Vektor und beinhaltet einen Teil der Vektorsequenz. In unmittelbarer Nachbarschaft zum 5'-Ende des Inserts wurde in der MCS des Vektors eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym HINDIII (5' - AAGCTT - 3') gewählt. Primer Nr. 1 enthält diese Schnittstelle an seinem 3'-Ende. Der Reverse-Primer des ersten Teilamplikats ist der Primer Nr. 2. Seine Sequenz enthält die identifizierte Punkt-Mutation an Base Nummer 698, bei der die Base Adenin durch die Base Guanin ersetzt wurde. Primer Nr. 3 ist der Forward-Primer des zweiten Teilamplikats. Seine Sequenz ist komplementär zur Sequenz des Reverse-Primers für das erste Teilamplifikat (Primer Nr. 2) und enthält ebenfalls die beschriebene Mutation. Für die Ligation des mutierten Gens in den GFPIre-Vektor wird am 3'-Ende des Inserts eine Schnittstelle benötigt, die auch in der MCS des Vektors vorkommt. Da eine solche Schnittstelle in der Gensequenz nicht gefunden werden konnte, musste mit Hilfe eines entsprechenden Primers diese Schnittstelle in das Insert eingeführt werden. Primer Nr. 4 ist der Reverse-Primer für das zweite Teilamplifikat und für das Amplifikat der Fusions-PCR. Er enthält in seiner Sequenz zwei Basensubstitutionen. Base Nummer 1.983 wurde von Guanin zu Adenin und Base Nummer 1.986 von Guanin zu Cytosin verändert, um dadurch eine Schnittstelle mit der Sequenz 5' - GAATTC - 3' für das Restriktionsenzym EcoRI zu schaffen.

Primer-nummer	Nucleotid-Sequenz des Primers	Primer-größe	Schmelztemperatur
1	5' - ATA CAA GCT TGG CTC AGG ATG GAG AC - 3'	26 bp	59,9°C
2	5' - ACC CAC GCC TGG GGC A - 3'	16 bp	57,7°C
3	5' - TGC CCC AGG CGT GGG T - 3'	16 bp	57,7°C
4	5' - TAA GAA TTC AGA CCT GAG ACG GGG C - 3'	25 bp	60,6°C

Tabelle 2: Aufgelistet sind Nummer, Sequenz (in 5'-3'-Richtung), Größe und Schmelztemperatur (nach Angaben des Herstellers) der einzelnen Sense-Primer für die Overlap-Extension-PCR.

2.3.1.1.1.3 PCR-Protokoll

Die PCR-Reaktionen wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 50 µl in 0,2 ml Eppendorf-Tubes im Thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) durchgeführt. Das Reaktionsgemisch für die erste PCR zur Erzeugung der Upstream- und Downstream-Teilamplifikate enthielt jeweils 2 µl des Forward- und Reverse-Primers (0,1 µg/µl), 0,5 µl der Pfu-Polymerase (2,5 U/µl) und 34 µl Template-DNA (10 pg/µl) in einer wässrigen Lösung aus 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 5 µl des dNTP-Gemisches und 1 µl MgSO₄. Die unterschiedlichen Temperaturschritte, die Reaktionszeiten und die Anzahl der PCR-Zyklen wurden entsprechend der verwendeten Primer und der erzeugten Amplifikatmenge empirisch optimiert. Für die PCR mit den Primern Nr. 1 und Nr. 2 wurden nach einer initialen Inkubation bei 95°C über 2 min 30 s, 40 Zyklen mit folgenden Parametern durchgeführt: 95°C über 1 min, 60°C über 30 s, 74°C über 2 min. Die finale Extensions-Phase betrug 5 min bei 74°C. Für die PCR mit den Primern Nr. 3 und Nr. 4 wurden bis auf eine veränderte Extensionszeit von 3 min pro Zyklus dieselben Parameter verwendet. Nach jeder PCR wurde die Gesamtmenge an Amplifikat zur Visualisierung und Bestimmung der erzeugten Menge auf einem Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt. Photometrische Konzentrationsbestimmungen waren nicht möglich, da die amplifizierte DNA-Menge (ca. 1,0 - 1,5 µg pro PCR) zu gering war. Zur Isolation der DNA aus dem Gel erfolgte die Anwendung des NucleoSpin-Extractio-Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Dazu wurden die Banden aus dem Agarosegel unter einer UV-Lampe ausgeschnitten, anschließend in mehreren Schritten gemäß Herstellerprotokoll aufgereinigt und in 16 µl H₂O pro PCR-Ansatz gelöst. Das Reaktionsgemisch für die Fusions-PCR enthielt als Template-DNA die isolierten Upstream- und Downstream-Teilamplifikate zusammen mit jeweils 2 µl der Primer Nr. 1 und Nr. 4 (0,1 µg/µl), sowie 0,5 µl Pfu-Polymerase (2,5 U/µl) in einer wässrigen Lösung aus 5 µl 10x Reaktionspuffer, 5 µl des dNTP-Gemisches und 1 µl MgSO₄. Die PCR wurden nach einer initialen Inkubation bei 95°C über 2 min 30 s, mit 40 Zyklen der folgenden Parametern durchgeführt: 95°C über 1 min, 60°C über 30 s, 74°C über 4 min. Die abschließende Extensions-Phase betrug 5 min bei 74°C. Nach der Gelelektrophorese des Amplifikats erfolgten die Isolation der identifizierten Banden und die Lösung der DNA in H₂O.

2.3.1.1.1.4 Ligation in Plasmidvektoren

Vor der Ligation des Amplifikats aus der Overlap-Extension-PCR in den GFPire-Vektor erfolgte die Linearisierung des zirkulären Vektors durch die Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII, die beide in der MCS des Vektors schneiden (siehe Abbildung 6). Zur Linearisierung wurden 30 µl Reaktionsvolumen, bestehend aus 1 ml GFPire-Vektor (6,7 µg/µl), je 1 µl (= 10 U) EcoRI und HindIII, 3 µl Puffer-Lösung und 24 µl Aqua-bidest, für 2 h bei 37°C inkubiert. Für die Restriktion des PCR-Amplifikats wurden 30 µl Amplifikat (30 ng/µl) zusammen mit je 0,5 µl EcoRI und HindIII, 4 µl 10 x Puffer und 5 µl Aqua-bidest für 2,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Ligation von Vektor und Amplifikat wurden 100 ng des aufgereinigten Vektors und 1 µg der aufgereinigten Mutante in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl 10 x Puffer, 6,5 µl Aqua-bidest und 1,5 Units T4-DNA-Ligase bei 4°C über Nacht inkubiert.

2.3.1.1.2 QuickChange-XL site-directed mutagenesis Kit

2.3.1.1.2.1 PCR-Methode

Für die Mutagenese der identifizierten Mutationen del185-187 im Gen KCNQ1, sowie R878L und delF1617 im Gen SCN5A wurde der QuickChange®-XL site-directed mutagenesis Kit der Firma Stratagene (La Jolla, USA) verwendet. Der QuickChange®-XL site-directed mutagenesis Kit macht sich die Eigenschaft bestimmter Restriktionsenzyme zu Nutze, nur methylierte DNA zu schneiden, um dadurch die Unterscheidung zwischen Amplifikat und Template zu ermöglichen. Die Vektoren mit den Wild-Typ-Genen wurden daher vor der SDM in dam⁺E.coli-Zellen vermehrt, da diese Bakterien DNA methylieren. Durch die PCR mit dem QuickChange®-XL site-directed mutagenesis Kit entsteht ein Amplifikat, das keine methylierte DNA enthält und daher während der anschließenden Inkubation mit einer speziellen Endonuklease im Gegensatz zur Template-DNA nicht geschnitten wird. Zwei weitere Besonderheiten dieser Methode bestehen darin, dass für die PCR insgesamt nur zwei, einander komplementäre Primer verwendet werden, die beide die Mutation enthalten und als Amplifikat, im Gegensatz zu anderen PCR-Methoden, ein zirkuläres Plasmid entsteht. Nach der Denaturierung lagern sich die Primer in der Annealing-Phase an die komplementären Vektorstränge an. Die Extension erfolgt durch eine Pfu-Turbo-Polymerase, die sich durch eine Proof-Reading-Funktion mit extrem geringer Fehlerquote auszeichnet. Während der Extensionsphase synthetisiert die Polymerase

ausgehend von den hybridisierten Primern die gesamte zirkuläre Plasmidsequenz. Im Anschluss an die PCR wird das Gemisch aus Template und Amplifikat mit einer DpnI-Endonuklease (Zielsequenz: 5' - GmATC - 3') inkubiert, die nur die methylierte DNA erkennt und spezifisch schneidet.

2.3.1.1.2.2 PCR-Primer

Für die PCR mit dem QuickChange®-XL site-directed mutagenesis Kit wurden zwei, einander komplementäre Primer verwendet, die beide die Mutation enthalten. Beim Design der Primer wurden, entsprechend den Protokollempfehlungen der Firma Stratagene, auf eine Primergröße zwischen 25 und 35 bp und auf eine Schmelztemperatur zwischen 65 und 85°C geachtet. Die Mutationen waren in der Mitte der Primersequenz lokalisiert.

cDNA	Nucleotid-Sequenz des Primers	Primer- größe	Schmelz- temperatur
Mutation del185-187 im Gen KCNQ1	5' - GCC GCA GCA AGT ACG TCT GGG GGC GGC - 3'	27 bp	83,3°C
Mutation R878L im Gen SCN5A	5' - CTC AGG CCT GCT GCC TCT CTG GCA CAT GAT GGA - 3'	33 bp	76,8°C
Mutation del F1617 im Gen SCN5A	5' - CCA GAA GTA CTT CTC CCC GAC GCT CTT CC - 3'	29 bp	67,3°C

Tabelle 3: Auflistung von Sequenz (in 5'-3'-Richtung), Größe und Schmelztemperatur (nach Angaben des Herstellers) der Sense-Primer für die PCR mit dem QuickChange®-XL site-directed mutagenesis Kit.

2.3.1.2.3 PCR-Protokoll

Für die PCR zur Erzeugung der Mutation del185-187 im Gen KCNQ1 wurden in 50 µl Reaktionsvolumen jeweils 1,25 µl des Forward- und Reverse-Primers (0,1 µg/µl), 1 µl Template-DNA (10 ng/µl), 1 µl dNTP-Mix, 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 3 µl QuickSolution, 1 µl Pfu-Turbo-Polymerase (2,5 U/µl) und 36,5 µl Aqua bidest. eingesetzt. Nach den Optimierungsversuchen wurde das von der Firma empfohlene Standard-Protokoll entsprechend abgewandelt und im Thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) durchgeführt. Nach 1 min Inkubation bei 95°C folgten 18 PCR-Zyklen mit den Parametern: 95°C für 50 s, 60°C für 50 s, 68°C für 16 s. Abschließend wurde der Reaktionsansatz bei 68°C für 7 min inkubiert.

Die PCR zur Erzeugung der Mutationen R878L und del F1617 im Gen SCN5A wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl mit jeweils 1,25 µl des Forward- und Reverse-Primers (0,1 µg/µl), 1 µl Template-DNA (10 ng/µl), 1 µl dNTP-Mix, 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 3 µl QuickSolution, 1 µl Pfu-Turbo-Polymerase (2,5 U/µl) und 36,5 µl Aqua bidest. durchgeführt. Die PCR erfolgte mit den Parametern: 1 min Inkubation bei 95°C, 18 PCR-Zyklen mit 95°C für 50 s, 60°C für 50 s und 68°C für 16 s. Für die abschließende Extension wurde der Reaktionsansatz für 7 min bei 68°C inkubiert.

Zur Trennung der mutierten von der nicht mutierten DNA nach der PCR mit dem QuickChange®-XL site-directed mutagenesis Kit wurde zu jedem Amplifikationsansatz 1 µl DpnI Restriktionsenzym (10 U/µl) (im Kit enthalten) zugegeben. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C.

2.3.1.1.3 PCR-Templates

Die zur Mutagenese verwendeten Wildtyp-Gene KCNQ1 und SCN5A wurden freundlicherweise von Herrn G. Tomaselli (Johns-Hopkins-University, Baltimore, USA) in der Multiple-Cloning-Site von GFP_{luc}-Vektoren (Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg, D) zur Verfügung gestellt. In diesen Vektoren ist eine kodierende Sequenz für ein grün leuchtendes Protein (GFP) der Multiple-Cloning-Site vorangestellt (siehe Abbildung 6). Bei erfolgreicher Expression des Vektors können transfizierte Zellen anhand ihrer grünen Farbe unter einem Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden.

2.3.1.2 Funktionelle Expression

2.3.1.2.1 Transformation der Plasmidvektoren in Bakterienkulturen

Für die Vermehrung der mutierten DNA erfolgte eine Transformation der entsprechenden Vektoren in kompetente Bakterienkulturen. Dazu wurde der Ligationsansatz aus Punkt 2.3.1.1.4 und die mit DpnI inkubierte DNA aus Punkt 2.3.1.2.3 mit jeweils 45 µl Escherichia coli (E.coli) Bakterien des Stamms XL 10 - gold (Stratgene, La Jolla, USA) gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Erhitzen des Reaktionsansatzes für 30 s auf 42°C wurde dieser für 2 min wieder auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend auf LB-Kanamycin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Da GFP_{Ire}-Vektoren ein Resistenz-Gen gegen das Antibiotikum Kanamycin beinhalten, wurde durch die Verwendung kanamycinhaltiger LB-Agarplatten das Wachstum von nicht transformierten Bakterien gehemmt. Pro Platte wurden anschließend 10 Einzelkolonien der plasmidtragenden E.coli XL 10 - gold Bakterien in 3 ml LB-Kanamycin-Medium überführt und im Wärmeschüttler bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.3.1.2.2 Isolation von Plasmid - DNA aus Bakterienkulturen

Zur Preparation von Plasmid-DNA aus den inkubierten, E.coli XL 10 - gold Bakterien wurde der Plasmid-Mini-Prep-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Im ersten Schritt erfolgte die Zentrifugation von jeweils 1,5 ml der LB-Kulturen in Eppendorf-Gefäßen für 10 sec bei maximaler Geschwindigkeit mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, D). Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet vollständig in 0,3 ml Puffer P1 gelöst und 0,3 ml Puffer P2 zugegeben, sowie für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 0,3 ml Puffer P3 zupipettiert und nach Inkubation für 5 min auf Eis das Gemisch für 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in mit dem Puffer QBT äquilibrierte Säulen pipettiert und die Säulen viermal hintereinander mit 1 ml Puffer QC gewaschen. Abschließend erfolgte die Eluierung der DNA mit 0,8 ml Puffer QF. Zum Reinigen wurde die DNA mit 0,7 Vol.% Isopropanol präzipitiert, gemischt und für 30 min bei 11000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde danach dekantiert, das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in DNA-H₂O gelöst (ca. 10 µl).

2.3.1.2.3 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäure

Zur Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration nach der Preparation wurde der Absorptionskoeffizient (OD) der gelösten DNA mit Hilfe eines Biophotometers (Eppendorf, Hamburg, D) bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gemessen und die Konzentration nach dem Lambert-Beer'sches Gesetz berechnet. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1, bei 1 cm Schichtdicke der Küvette, einer Konzentration der doppelsträngigen DNA von 50 µg/ml. Da aromatische Aminosäurereste Licht mit einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren, erfolgte zur Konzentrationsbestimmung der Proteine der Lösungen die Messung der Absorptionskoeffizienten bei 280 nm. Die Reinheit der DNA-Lösung wurde mit Hilfe der Warburgschen Formel $((1.45 \times OD_{280}) - (0.74 \times OD_{260})) = \text{mg Protein/ml}$ berechnet und betrug zwischen 1,8 bis 1,95.

2.3.1.2.4 Sequenzierung

Die preparierte Plasmid-DNA mit den Mutanten wurde mit Hilfe der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al. (1977) sequenziert. Dazu wurde ein ABI-PRISM-Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit (Perkin-Elmer, Überlingen, D) verwendet. Die Auswahl der Sequenzierprimer im jeweiligen Gen erfolgte mit einem Abstand von durchschnittlich 400 bp und einer Länge von 15 bp. In jedem Sequenzieransatz von 8 µl befanden sich 7 µl zirkuläres Plasmid (100 ng/ml) aus der Mini-Preparation und 1 µl des entsprechenden Primers (5 µM). Die Sequenzierreaktion und die anschließende Sequenzerstellung wurden freundlicherweise vom Labor für Molekularbiologie unter der Leitung von Herrn Peter Lohse im Institut für Klinische Chemie am Klinikum der Universität München, Großhadern, durchgeführt. Die erstellten Sequenzausdrucke wurden abschließend mit den Sequenzen der verwendeten Wildtyp Gene computergestützt mit Software aus dem Internet (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) verglichen. Wenn eine Sequenzübereinstimmung vorlag und die jeweilige Mutation identifiziert werden konnte, erfolgte aus den entsprechenden E.coli XL 10-gold Bakterienkolonien eine Preparation mit dem Plasmid Maxi Prep Kit (Qiagen, Hilden, D) gemäß Herstellerprotokoll und eine Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäure (siehe Kapitel 2.3.1.2.3).

2.3.1.2.5 Transfektion von Zellen

Die funktionelle Expression der identifizierten Mutationen erfolgte in zwei verschiedenen Zellreihen, freundlicherweise bereitgestellt von Herrn G. Tomaselli (Johns-Hopkins-University, Baltimore, USA). Für die Kaliumkanal-Mutanten wurden murine Fibroblastenzellen aus einer LTK-Zellreihe (ATCC-Nummer: CCL 1.3) und für die Natriumkanal-Mutanten humane embryonale Nierenzellen aus einer HEK 293 - Zellreihe (ATCC-Nummer: CRL 1573) verwendet. Diese Zellreihen besitzen eine hohe Translationsfähigkeit und exprimierte Ionenkanäle werden in die Zellmembran eingebaut. Daher sind sie ideal geeignet für Patch-Clamp Messungen. LTK-Zellen exprimieren zudem keine eigenen Kaliumkanäle und HEK-Zellen keine eigenen Natriumkanäle in ihrer Zellmembran.

Die transiente Transfektion der Zellen mit der mutagenen DNA erfolgte mittels Polyfectin-Reagenz (Biontex München, D). Die Transfektion mit diesem polykationischen Transfektionsreagenz basiert auf der Liposomen-Technik, bei der zunächst DNA-Lipidkomplexe gebildet werden, die dann durch Endosmose die Zellmembran passieren. Zur Vorbereitung der elektrophysiologischen Untersuchungen an den exprimierten Ionenkanal-Mutanten wurden mehrere Petrischalen (3,5 cm Durchmesser) mit jeweils ca. 30 kleinen Stückchen zurechtgeschnittener Deckgläschen und 2 ml DMEM bedeckt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 ml Zellsuspension pro Petrischale und die Inkubation für 24 Stunden bei 5 % CO₂ und 37°C. Für die Transfektion wurden zwei Lösungen mit je 60 µl Medium hergestellt, eine mit 1 µg cDNA und eine mit 5 µl Polyfectin. Zur Ausbildung des DNA-Lipidkomplexes wurden beide Lösungen vorsichtig gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während einer fünfstündigen Inkubation (5 % CO₂ und 37°C) mit den jeweiligen Zellen in 5 % FCS und DMEM-Medium erfolgte die intrazelluläre Aufnahme des DNA-Lipidkomplexes. Im Anschluss wurden die Zellen bei 5 % CO₂ und 37°C aufbewahrt und das Medium alle 24 Stunden gewechselt. Bei erfolgreicher Expression des GFP-Ire-Vektors konnten die Zellen anhand ihrer grünen Farbe unter einem Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden. Nach durchschnittlich vier Tagen hatten ca. 1 - 5% der transfizierten Zellen eine starke Expression und wurden unter UV-Licht (488 nm Wellenlänge) durch ihre grüne Fluoreszenz identifiziert und für die elektrophysiologischen Untersuchungen ausgewählt.

2.3.1.3 Lösungen für Molekularbiologie und Zellbiologie

Alle Chemikalien ohne entsprechenden Vermerk stammten von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland). DMEM wurde von Biochrom (Berlin, Deutschland) und MEM von Gibco Life Technologies GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Bei nicht aufgeführten Geräten und Einweg-Verbrauchsmaterialien handelte es sich um labortypische Standardausrüstung.

Kanamycin-Lösung :	0,1 g/ml Kanamycin in H ₂ O
TE-Puffer :	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
TAE-Puffer :	40 mM Tris, 10 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 7,5
LB-Agar :	15 g Bacto-Agar auf 1 l LB-Medium, autoklaviert
LB-Medium :	10 g/l NaCl, 10 g/l Caseinhydrolysat, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,4 (NaOH), autoklaviert
LTK-Zellmedium :	DMEM-Medium (4,5 g/l Glucose, 1,03 g/l L-Glutamin), Streptomycin, 100 µg/ml Penicillin, 15 mM HEPES, 10% FCS (fetales Kälberserum)
HEK-Zellmedium:	DMEM-Medium (1,0 g/l Glucose, 1,028 g/l L-Glutamin), 10 % FCS (fetales Kälberserum), 0,2 mg/ml Geneticin

2.3.1.4 Enzyme und Oligonukleotide

Die verwendeten Restriktionsenzyme sowie die DNA-Längenmarker (100bp plus) wurden von der Firma MBI-Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland) und die T4-DNA-Ligase von der Firma Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) bezogen. Die Pfu-Polymerase und das dNTP-Gemisch für die Overlap-Extension-PCR stammten von der Firma Promega (Madison, USA). Alle PCR-Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma Interactiva (Ulm, Deutschland) entsalzt und hydrolysiert bezogen, in TE Puffer gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Das Design der Primer erfolgte mit Hilfe der „Primer Express“-Software der Firma Perkin Elmer (Wellesley, USA).

2.3.2 Elektrophysiologische Methoden

2.3.2.1 Aufbau des Messplatzes

Die elektrophysiologischen Messungen an den transfizierten Zellen wurden mittels der Patch-Clamp Technik durchgeführt (Neher et al., 1976). Der Messplatz befand sich zur Reduzierung störender Erschütterungen auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Zur Abschirmung vor äußeren elektrischen Strömen war der Mess-Stand von einem Faraday'schen Käfig umgeben und geerdet. Die Messungen erfolgten in der Ganzzellkonfiguration mit einem Axopatch 200B Patch-Clamp Verstärker (Axon Laboratories, Union City, USA). Zur Identifikation der erfolgreich transfizierten Zellen diente das Mikroskop Axiovert 25 (Carl Zeiss GmbH, Göttingen, D). Die Herstellung der verwendeten Pipetten erfolgte aus Borosilikatglas mit Filament (innerer Durchmesser 1,2 mm, äußerer Durchmesser 1,5 mm, Wandstärke 0,15 mm, Länge 80 mm, Firma Hilgenberg, Malsfelden, D) mittels eines Zweistufen-Vertikal Pipettenziehgerätes (Ochotzki, Homburg, D). Der Pipettenwiderstand betrug nach Füllung mit der internen Pipettenlösung zwischen 1,5 und 4 Megaohm. Der Pipettenhalter war mit einem hydraulischen Mikromanipulator (MHW-3, Narashige Scientific Instruments, Japan) und dem Vorverstärker verbunden. Die Datenaufnahme (Digitalisierungsfrequenz 2 - 5 kHz) erfolgte mit dem Programm Clampex (Axon Laboratories, Union City, USA).

2.3.2.2 Durchführung der Patch-Clamp Messung

Aus den Petrischalen mit den transfizierten LTK-Zellkulturen und den HEK-Zellkulturen wurde jeweils ein Deckgläschen entnommen, in die Kammer des Mikroskops gelegt und mit einer kalziumhaltigen Tyrodelösung mit 3 ml/min umspült. Sämtliche Experimente wurden bei Raumtemperatur (20 - 22°C) durchgeführt. Die Bestimmung der Zellkapazität erfolgte durch Integration des zum Umladen der Zellmembran erforderlichen Stromes nach Rückkehr zu -80 mV von hyperpolarisierenden Spannungssprüngen von -85 mV bis -110 mV in 5 mV Schritten. Bei -80 mV konnten keine zeitabhängigen Ströme registriert werden. Die anderen verwendeten Spannungsprotokolle sind in den jeweiligen Abbildungen angegeben.

2.3.2.3. Lösungen für Elektrophysiologie

Standardpipettenlösung : 125 mM Kaliumglutamat, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA 2 mM MgCl_2 , 5 mM MgATP, pH 7,2 mit KOH

Extrazelluläre Perfusionslösung: 138 mM NaCl, 4 mM KCl, 0,33 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Glukose, 10 mM HEPES (Natriumsalz), 1 mM MgCl_2 ; 2 mM CaCl_2 , 0,3 mM CdCl_2 ; pH 7,3 mit NaOH

Modifizierte "KB"-Lösung [in mM]: 96 Kaliumaspartat, 24 KCl, 12 KH_2PO_4 , 12 Glukose, 0.5 EGTA (Kaliumsalz), 12 Taurin, 12 Natriumpyruvat, 1,2 % bovines Serumalbumin; pH 7,3 mit KOH (EGTA = Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)]tetraacetat)

"Null-Kalzium-Tyrode" (Zellisolation) [in mM]: 138 NaCl, 4 KCl, 0,33 NaH_2PO_4 , 10 Glukose, 10 HEPES (Natriumsalz), 1 MgCl_2 ; pH 7,3 mit NaOH (HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazino)-Ethansulfonsäure).

3 Ergebnisse

3.1 Indexpatient M.P. (LQT1)

3.1.1 Phänotypische Charakterisierung

3.1.1.1 Anamnese

Der Indexpatient M.P., ein bis dahin gesunder Junge, hatte im Alter von 13 Jahren einen Beinahe-Ertrinkungsunfall. Er wurde beim Schwimmunterricht kopfunter im Wasser treibend aufgefunden. Es wurde nicht beobachtet, dass er kurz zuvor ins Becken gesprungen war. Bei nicht tastbarem Puls erfolgte zunächst die Laienreanimation durch den Sportlehrer. Der alarmierte Notarzt stellte im EKG Kammerflimmern fest, welches durch einmaliges Defibrillieren in einen stabilen Sinusrhythmus überführt werden konnte. Im Krankenhaus waren die körperlichen und neurologischen Untersuchungen unauffällig, die Blutlaborwerte lagen im Normbereich. Die Röntgenaufnahmen vom Thorax und der Wirbelsäule, sowie eine Schädel-CT-Aufnahme waren ebenfalls unauffällig. Die echokardiographische Untersuchung ergab einen Normalbefund. Aufgrund des Reanimationsereignisses und einer deutlich verlängerten QT_c-Zeit im Ruhe-EKG wurde die Implantation eines intrakardialen Defibrillators empfohlen, aber von den Eltern abgelehnt. Daher erfolgte bei Verdacht auf ein LQTS eine medikamentöse Therapie mit β -Blocker.

3.1.1.2 EKG-Diagnostik

Die Ruhe-EKG-Untersuchung während des stationären Aufenthaltes nach dem Reanimationsereignis zeigte: regelmäßiger Sinusrhythmus, Herzfrequenz = 102/min, Steillagetyp, Herzzeiten: PQ = 0,12 s, QRS = 0,08 s, RR = 0,57 s, QT = 0,41 s, QT_c = 0,543 s, inkompletter Rechtsschenkelblock, keine Hypertrophiezeichen, keine ischämietypischen ST-Streckenveränderungen, unauffällige Erregungsausbreitung, T-Wellen mit einer breitbasigen Morphologie, QT_{onset-c} = 0,32 s, QT_{peak-c} = 0,42 s, T_{Wellenlänge-c} = 0,21 s, T-Wellenamplitude = 0,12 mV.

In der Belastungs-EKG-Untersuchung zeigten sich keine Rhythmusstörungen. Die QT_c-Zeit betrug vor Belastung 471 Millisekunden und während maximaler Belastung 480 Millisekunden.

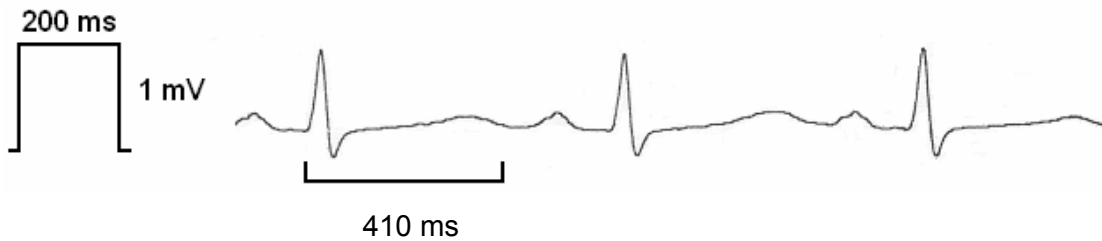


Abbildung 7: Ruhe-EKG des Indexpatienten P.M. mit Ableitung II und eingezeichneter QT-Strecken-Messung.

3.1.1.3 Diagnosestellung

Aufgrund der deutlich verlängerten QT_c-Zeit wurde zur Diagnosestellung eines LQTS der Diagnostik-Score nach Schwartz angewendet (vergleiche Seite 26 - 27).

EKG-Veränderungen:

zu A: Für die QT_c-Zeit von 543 ms in der Ruhe-EKG-Untersuchung wurden drei Punkte gewertet.

zu B: Nach dem Beinahe-Ertrinken wurde im EKG Kammerflimmern dokumentiert, eine möglicherweise vorausgegangenen Torsades de Pointes - Arrhythmie konnte nicht bewiesen werden (0 Punkte).

zu C / D: Es wurden weder T-Wellen-Alternationen noch gehöckerte T-Wellen identifiziert (0 Punkte).

Klinische Ereignisse:

zu A / B: Synkopen sind aus der Vorgeschichte nicht bekannt, eine angeborene Taubheit besteht nicht (0 Punkte).

Familiäre Belastung:

zu A / B: In der Familienanamnese sind kein diagnostiziertes LQTS und kein ungeklärter Todesfall vor dem 30. Lebensjahr bekannt (0 Punkte).

Die Gesamtzahl von drei vergebenen Punkten für M.P. im Schwartz-Score entspricht einer mittleren Wahrscheinlichkeit für ein LQTS (vergleiche Seite 27).

3.1.2 Genotypische Charakterisierung

In der molekulargenetischen Untersuchung wurde bei dem Indexpatienten M.P. die Substitutions-Mutation T322A im Gen KCNQ1 an der Nucleotidposition 964 identifiziert. Durch die Veränderung des ursprünglichen Basentriplets von ACG zu GCG (Position 964-966) wird statt der neutralen und polaren Aminosäure Threonin (Position 322) die aliphatische, neutrale und unpolare Aminosäure Alanin codiert. Die Mutation befindet sich in der extrazellulären Region zwischen der Pore und dem transmembranären Segment 6. In der Literatur wurde diese Mutation bisher nicht beschrieben.

5'													3'	
315	Y	G	D	K	V	P	Q	T	W	V	G	K	T	I
943	<u>TAT GGG GAC AAG GTG CCC</u>						CAG	A	CG	TGG	GTC	<u>GGG AAG ACC ATC</u>		
	Porenregion						extrazellulär			Segment 6				

Abbildung 8: Sequenzausschnitt des Gens KCNQ1 nach Splawski et al. (1998). In der oberen Reihe ist die Aminosäuresequenz und in der unteren Reihe die Basensequenz des Sense-Stranges dargestellt. Die von der Substitution betroffene Base an Position 964 und die entsprechende Aminosäure sind mit gekennzeichnet. Unter dem Sequenzausschnitt ist die Tertiärstruktur des Proteins beschrieben.

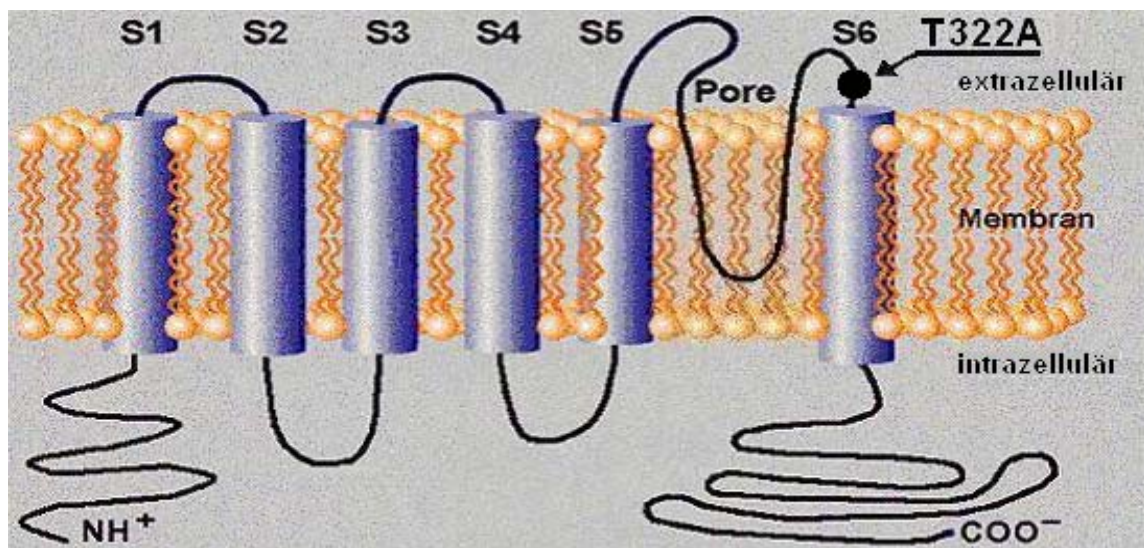


Abbildung 9: Schematische Darstellung der porenbildenden Untereinheit des myokardialen Kaliumkanals I_{Ks} (nach L.A. Larsen, LQTS Database). S1 bis S6 bezeichnen die transmembranären Segmente. Der schwarze Punkt kennzeichnet die Position der identifizierten Mutation T322A.

3.1.3 Familienanamnese

Zu den klinisch und genetisch untersuchten Familienangehörigen des Indexpatienten M.P. gehören die Mutter I.P. und der Vater W.P. Bei der Mutter I.P. besteht ein kardiales Risikoprofil durch den Konsum von 20 Zigaretten täglich. In ambulanten kardiologischen Untersuchungen wegen subjektiver Palpitationen und intermittierendem Herzrasen seit zirka 30 Jahren, konnte keine strukturelle Herzerkrankung festgestellt werden. Im Elektrokardiogramm wurde eine frequenz-korrigierte QT-Zeit von 406 ms gemessen, es traten keine T-Wellen-Alternationen, keine gehöckerten T-Wellen und keine Torsades de Pointes - Arrhythmien auf. Im Diagnostik-Score nach Schwartz wurde ihr ein Punkt für die Diagnose eines LQTS in der Familie vergeben. Damit besteht bei I.P. eine niedrige Wahrscheinlichkeit für ein LQTS. In der genetischen Zieldiagnostik konnte bei ihr keine Mutation nachgewiesen werden.

Bei dem Vater W.P. besteht keine kardiale Vorerkrankung. Der EKG-Befund zeigte eine QT_c-Zeit von 447 ms, keine T-Wellen-Alternationen, keine gehöckerte T-Wellen und keine Torsades de Pointes - Arrhythmien. Im Diagnostik-Score nach Schwartz wurde ihm ein Punkt für die Diagnose eines LQTS in der Familie vergeben. Damit besteht für W.P. ebenfalls eine niedrige Wahrscheinlichkeit für ein LQTS. Die genetische Zieldiagnostik identifizierte bei ihm die gleiche Mutation wie bei seinem Sohn M.P.

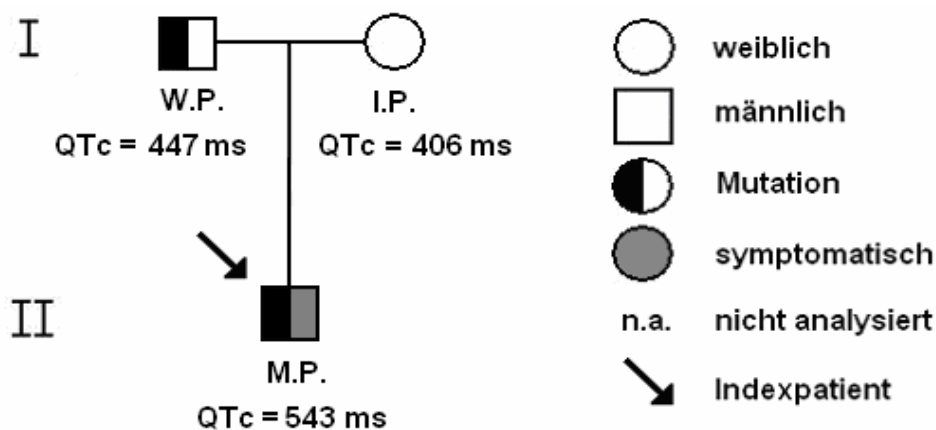


Abbildung 10: Familienstammbaum des Indexpatienten M.P. Die Elterngeneration ist mit I und die Generation des Indexpatienten mit II gekennzeichnet.

3.1.4 Funktionelle Charakterisierung

3.1.4.1 Funktionelle Expression der Mutation T322A im Gen KCNQ1

Die Mutagenese von T322A im Gen KCNQ1 erfolgte mit Hilfe der Overlap-Extension-PCR Methode (Higuchi et al., 1988, vergleiche dazu Kapitel 2.3.1.1.1). In den ersten Schritten der Overlap-Extension-PCR wurden mit je einem mutagenen und einem äußeren Primer in zwei getrennten PCR-Ansätzen ein Upstream- und ein Downstream-Teilamplifikat erzeugt. In Abbildung 11 ist das Agarosegel mit zwei Upstream-Teilamplikaten zwischen der 900 bp und der 1031 bp Marke und zwei Downstream-Teilamplikaten in Höhe der 1200 bp Marke dargestellt.

Nach der Isolation aus dem Gel wurden die Teilamplifikate zusammen mit den flankierenden Primern in eine zweite PCR eingesetzt. Das amplifizierte PCR-Produkt war spezifisch, da Abbildung 12 das Agarosegel mit dem Amplifikat aus der Fusions-PCR auf der gleichen Höhe (2000 bp) wie die Positiv-Kontrolle (Wildtyp-Gen) zeigt.

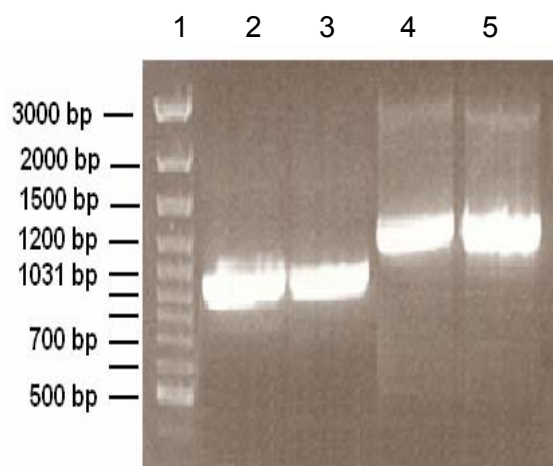


Abbildung 11: Agarosegel mit folgenden Banden: 1 = DNA-Ladder, 2 = Upstream-Teilamplifikat, 3 = Upstream-Teilamplifikat, 4 = Downstream-Teilamplifikat, 5 = Downstream-Teilamplifikat

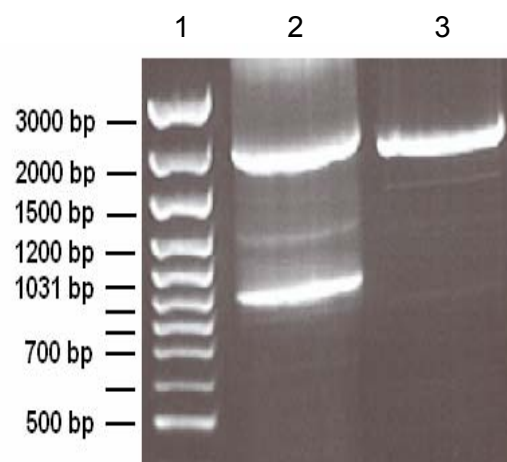


Abbildung 12: Agarosegel mit folgenden Banden: 1 = DNA-Ladder, 2 = Amplifikat aus der Fusions-PCR, 3 = Positiv-Kontrolle

Nach der Ligation des Amplifikates aus der Overlap-Extension-PCR in einen GFP β -Vektor, der Vermehrung in kompetenten Bakterienkulturen und der Mini-Preparation wurde das amplifizierte DNA-Fragment zur Kontrolle des Vorhandenseins der entsprechenden Mutation direkt sequenziert. Die Sequenzierreaktion der Mutante lieferte an der Stelle der eingefügten Mutation ein eindeutig unterscheidbares Fluoreszenzsignal, so dass die erfolgreiche Mutagenese bewiesen werden konnte (siehe Abbildung 14). Durch den abschließenden Vergleich des jeweils erstellten Sequenzausdruckes mit den Sequenzen der verwendeten Wild-Typ Gene wurden Fehler während der PCR-Mutagenese ausgeschlossen. Nach der erfolgreichen Verifizierung der Mutagenese durch die Sequenzierung erfolgte die Transfektion der GFP β -Vektoren in murine Fibroblastenzellen (LTK-Zellen) zur funktionellen Expression der Mutanten.

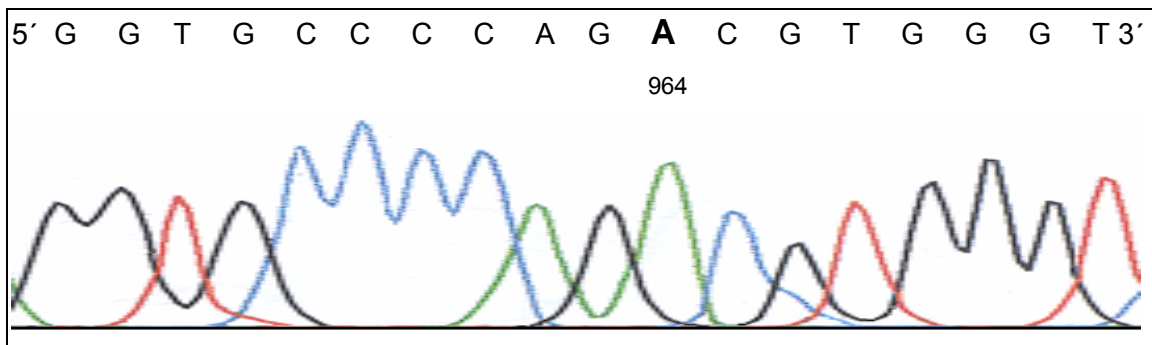


Abbildung 13: Fluoreszenzauswertung der Sequenzierreaktion des Wildtyp-Gens KCNQ1. Die Buchstaben über den Kurven bezeichnen die jeweilige Base. Die Nummer bezieht sich auf die Position der Base Adenin in der Basensequenz.

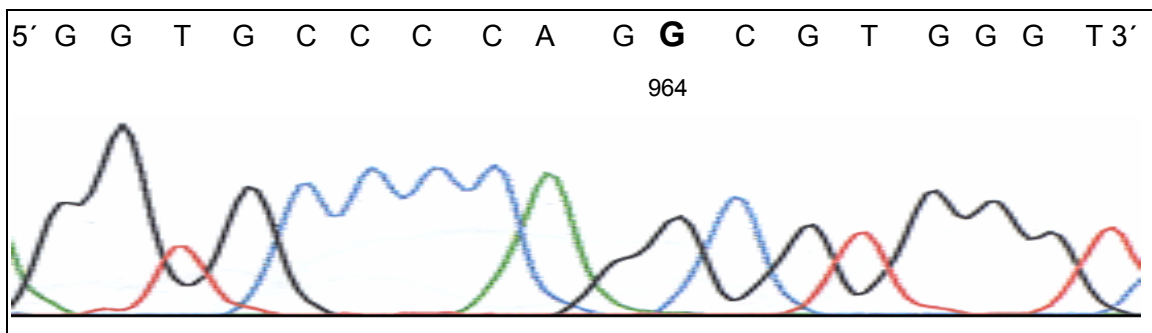


Abbildung 14: Fluoreszenzauswertung der Sequenzierreaktion nach der Mutagenese des Gens KCNQ1. An der Position 964 des Codons wurde Adenin durch Guanin ersetzt.

3.1.4.2 Elektrophysiologische Untersuchung der Mutation T322A im Gen KCNQ1

Um die Auswirkungen der identifizierten Substitutionsmutation im Gen KCNQ1 auf die Funktion der α -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks} elektrophysiologisch zu charakterisieren, wurden die Membranströme der LTK-Zellen mit der exprimierten Mutation T322A mit Hilfe der Patch-Clamp Technik untersucht. Dabei erfolgte eine Aktivierung der auswärts rektifizierenden Kaliumströme in den Zellen durch depolarisierende Spannungssprünge zu Potentialen positiver als -30 mV. Zum Vergleich wurde die elektrophysiologische Messung mit der Patch-Clamp Technik an LTK-Zellen mit dem exprimierten KCNQ1-Wildtyp durchgeführt.

Wie Abbildung 15 zeigt, konnten keine Stromkurven von I_{Ks} an den Zellen mit der exprimierten Mutation T322A gemessen werden.

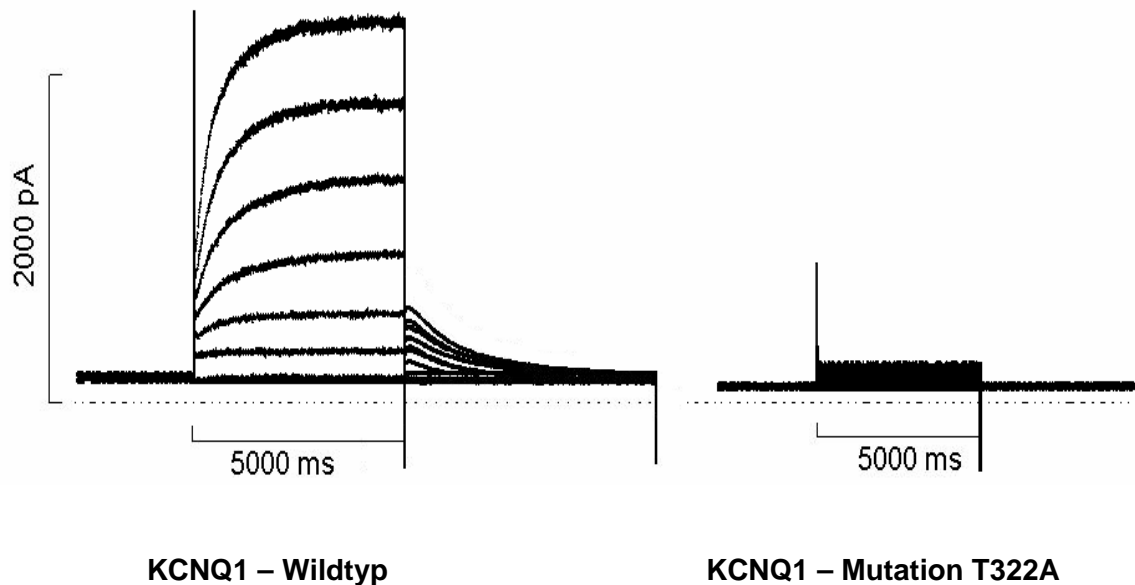


Abbildung 15: Kaliumauswärtsstrom in LTK-Zellen mit dem KCNQ1-Wildtyp (links) und mit der KCNQ1-Mutation T322A (rechts). Dargestellt sind Serien von Stromkurven von I_{Ks} bei depolarisierenden Spannungssprüngen von -30 mV bis +80 mV in 10 mV Abständen.

3.2 Indexpatientin C.W. (LQT1)

3.2.1 Phänotypische Charakterisierung

3.2.1.1 Anamnese

Bei der Indexpatientin C.W. waren in der späten Kindheit rezidivierende Anfälle mit Schwindelgefühlen und plötzlicher Bewusstlosigkeit in Ruhe und bei Belastung aufgetreten. Bei Verdacht auf ein Krampfleiden erhielt sie von der Pubertät bis zur ihrer Schwangerschaft im Alter von 31 Jahren eine antiepileptische Therapie. Einnässen, tonisch-klonische Phasen oder Zungenbisse wurden nicht beobachtet. Die Schwangerschaft mit ihrer Tochter S.W. verlief unauffällig, bei der Spontanentbindung gab es keine Komplikationen. Vier Monate nach der Entbindung verspürte die Patientin in Gegenwart der Familie plötzlich Übelkeit und brach kurz darauf bewusstlos zusammen. Nach Angaben ihrer Eltern war sie nicht ansprechbar und es konnte weder Puls noch Atmung festgestellt werden. Die Eltern begannen daraufhin umgehend mit der Laienreanimation und verständigten den Hausarzt, der nach fünf Minuten eintraf und die Reanimation fortführte. Nach Ankunft des Notarztes erfolgte der Transport in das nächstgelegene Krankenhaus. Bei Aufnahme zeigte sich in der EKG-Untersuchung eine deutlich verlängerte QT_c-Zeit. Am zweiten Tag der stationären Behandlung trat eine Tachyarrhythmie vom Typ Torsades de Pointes auf, die mit Defibrillationen erfolgreich therapiert werden konnte. Anschließend wurde eine β -Blocker-Therapie begonnen. Hierunter zeigte sich ein stabiler Sinusrhythmus und es traten keine weiteren Arrhythmien auf. Der weitere Verlauf war bestimmt durch die Entwicklung eines hypoxischen Mittelhirnsyndroms mit schweren neuro-psychologischen Defiziten. Nach ausführlicher Beratung mit dem Ehemann und den Eltern der Patientin entschloss man sich zur Fortführung der medikamentösen Therapie mit β -Blockern und verzichtete auf die Implantation eines intrakardialen Defibrillators.

3.2.1.2 EKG-Diagnostik

Die Ruhe-EKG-Untersuchung ohne β -Blocker achtzehn Tage nach dem Reanimationsereignis zeigte: regelmäßiger Sinusrhythmus, Herzfrequenz = 85/min, Mittellagetyt, Herzzeiten: PQ = 0,1 s, QRS = 0,08 s, RR = 0,72 s, QT = 0,44 s, QT_c = 0,52 s, keine Blockbildung, keine Hypertrophiezeichen, keine ischämietypischen ST-Streckenveränderungen, unauffällige Erregungsausbreitung.

Die T-Wellen zeigten eine breitbasige Morphologie, $T_{\text{Wellenlänge-c}} = 0,35 \text{ s}$, T-Wellen-Amplitude = 0,4 mV, $QT_{\text{onset-c}} = 0,24 \text{ s}$, $QT_{\text{peak-c}} = 0,46 \text{ s}$. Eine ergometrische Untersuchung war wegen der schweren neurologischen Symptomatik nicht möglich

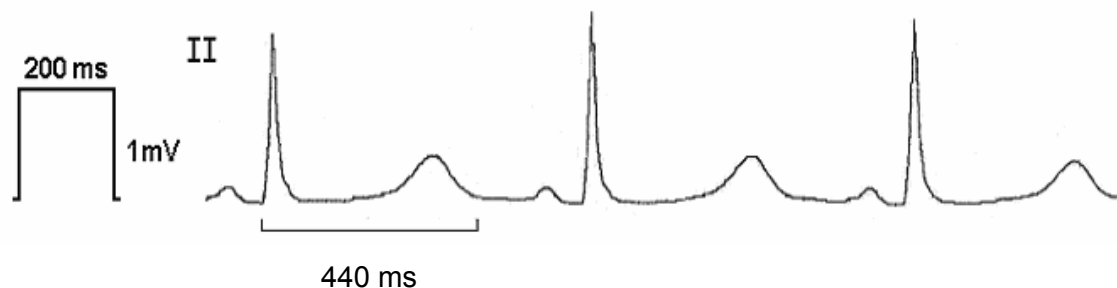


Abbildung 16: Ruhe-EKG der Indexpatientin C.W. mit Ableitung II und eingezeichneter QT-Strecken-Messung.

3.2.1.3 Diagnosestellung

Aufgrund der deutlich verlängerten QT_c -Zeit wurde zur Diagnosestellung eines LQTS der Diagnostik-Score nach Schwartz angewendet (vergleiche Seite 26 - 27):

EKG-Veränderungen:

Zu A: Für die QT_c -Zeit von 519 ms in der EKG-Untersuchung wurden drei von drei Punkten gewertet.

Zu B: Die dokumentierten Rhythmusstörungen vom Typ Torsades de Pointes im Verlauf des stationären Aufenthaltes nach dem Reanimationseignis entsprechen zwei von zwei Punkten.

Zu C: In der EKG-Untersuchung wurden weder T-Wellen Alternationen noch gehöckerte T-Wellen identifiziert (0 Punkte).

Klinische Ereignisse:

Zu A: Bereits in der Kindheit der Indexpatientin traten rezidivierende Synkopen in Ruhe und bei Belastung auf. Da bereits bei dem Kriterium EKG-Veränderungen die Torsades de Pointes - Arrhythmien gewertet wurde, können keine Punkte für die Synkopen vergeben werden.

Zu B: Eine angeborene Taubheit besteht bei C.W. nicht (0 Punkte).

Familiäre Belastung:

Zu A: In der Familienanamnese ist kein diagnostiziertes LQTS bekannt (0 Punkte).

Zu B: Da eine Schwester der Indexpatientin vor dem 30. Lebensjahr an einem plötzlichen Herztod verstarb, wurde $\frac{1}{2}$ von $\frac{1}{2}$ Punkt gewertet.

Insgesamt erreichte C.W. 5½ Punkte im Diagnostik-Score nach Schwartz. Das entspricht einer hohen Wahrscheinlichkeit für ein LQTS (vergleiche Seite 27).

3.2.2 Genotypische Charakterisierung

Die molekulargenetische Untersuchung der Indexpatientin C.W. identifizierte die sechs Basenpaare umfassende Deletions-Mutation del185-187 im Gen KCNQ1 an den Nucleotidpositionen 555-560. Durch die Deletion kommt es zu keiner Verschiebung des Leserasters. Von der Deletion sind die aliphatischen, neutralen und unpolaren Aminosäuren Valin (Position 185), Glycin (Position 186) und Leucin (Position 187) betroffen, wobei Glycin und Leucin vollkommen wegfallen und das für die Aminosäure Valin codierende Basentriplet von GTG zu GTC (Position 553-555) verändert wurde. Die Mutation befindet sich im intrazellulären Bereich der porenbildenden Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks} zwischen den transmembranären Segmenten 2 und 3 und wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

5' 3'

179 G C R S K Y V G L W G R L R

535 GGC TGC CGC AGC AAG TAC GTG GGC CTC TGG GGG CGG CTG CGC

intrazellulär

Abbildung 17: Sequenzausschnitt des Gens KCNQ1 nach Splawski et al. (1998). In der oberen Reihe ist die Aminosäuresequenz und in der unteren Reihe die Basensequenz des Sense-Stranges dargestellt. Die von der Deletion betroffenen Basen (Position 555 - 560) und die entsprechenden Aminosäuren (Position 185 - 187) sind mit gekennzeichnet. Die Tertiärstruktur des Proteins steht in der untersten Zeile.

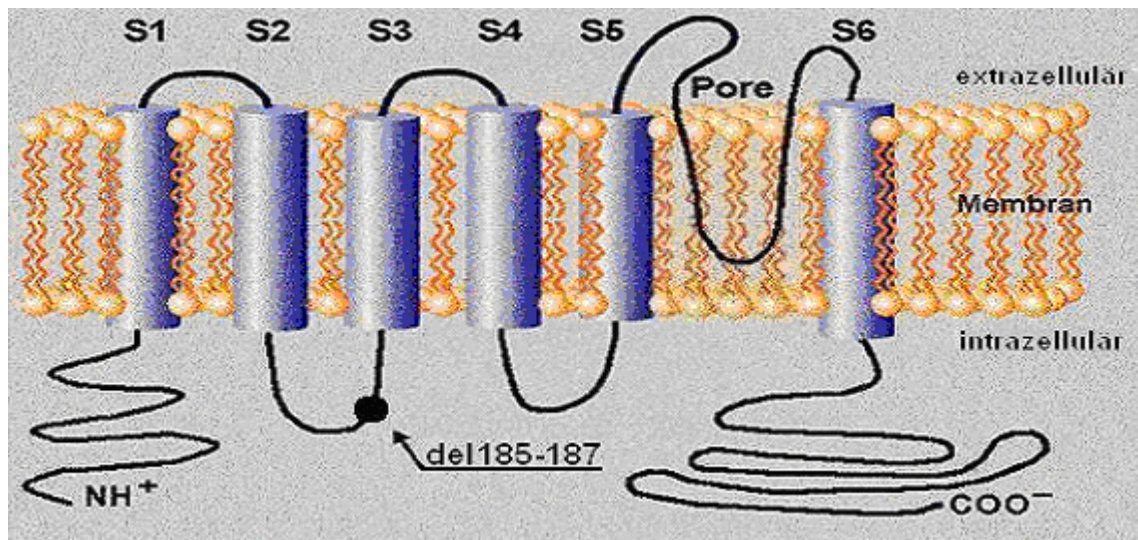


Abbildung 18: Schematische Darstellung des myokardialen Kaliumkanals KCNQ1 (nach L.A. Larsen, LQTS Database). Der schwarze Punkt kennzeichnet die Position der identifizierten Mutationen del185-187.

3.2.3 Familienanamnese

Die untersuchten Familienmitglieder der Indexpatientin C.W. verteilen sich auf drei Generationen. Zur Elterngeneration gehören die Mutter S.W. und der Vater A.W. und zur Generation der Indexpatientin drei lebende (A.S., T.W., K.W.) und eine verstorbene (B.B.) Schwester. Die Kindergeneration besteht aus der Tochter (S.W.) der Indexpatientin, den zweieiigen Zwillingen (S.B., F.B.) von B.B., sowie der Tochter (C.S.) von A.S.

Die Mutter S.W. beschreibt rezidivierende Synkopen bei Stress in der Kindheit. Während eines stationären Aufenthaltes zum Ausschluss eines LQTS war der körperliche Untersuchungsbefund unauffällig und die untersuchten laborchemischen Parameter lagen im Normbereich. Im Ruhe-EKG zeigten sich keine Auffälligkeiten bis auf eine verlängerte QT_c-Zeit von 496 ms. Im Diagnostik-Score nach Schwartz wurden zwei Punkte für die verlängerte QT_c-Zeit, zwei Punkte für die Synkopen bei Stress, ein Punkt für das Vorliegen eines LQTS bei ihrer Tochter C.W. (Indexpatientin) und ein halber Punkt für den ungeklärten Todesfall unter dem 30. Lebensjahr ihrer Tochter B.B. vergeben. Insgesamt erreichte S.W. 5½ Punkte. Das entspricht einer hohen Wahrscheinlichkeit für ein LQTS. Eine molekulargenetische Untersuchung lehnte sie jedoch ab.

Bei dem Vater A.W. bestehen außer einer arteriellen Hypertonie und einer Hyperurikämie keine Vorerkrankungen. Die körperliche Untersuchung und die Laborparameter waren unauffällig. Im Ruhe-KG zeigte sich außer einer linksventrikulären Hypertrophie ein altersentsprechender Normalbefund mit einer QT_c-Zeit von 401 ms. Im Diagnostik-Score wurden für das Vorliegen eines LQTS und eines ungeklärten Todesfalles in der Familie insgesamt 1½ Punkte vergeben. Damit besteht für A.W. ein geringes bis mittleres Risiko für ein LQTS. Auch er lehnte eine molekulargenetischen Untersuchung ab.

Die zwei Jahre jüngere Schwester der Indexpatienten B.B. wurde im Alter von 22 Jahren morgens tot im Bett aufgefunden. Bei ihr waren keine Vorerkrankungen bekannt und als Todesursache wurde ein plötzlicher Herztod diagnostiziert. K.W. ist die jüngste Schwester der Indexpatientin. Bei ihr bestehen keine Vorerkrankungen und die körperlichen Untersuchungsbefunde waren unauffällig. Das Ruhe-EKG zeigte bis auf eine verlängerte QT_c-Zeit von 489 ms keine Auffälligkeiten. In der ergometrischen Untersuchung betrug die QT_c-Zeit unter Beta-Blocker-Therapie in Ruhe 445 ms und während maximaler Belastung 499 ms. Im Diagnostik-Score erhielt sie für die verlängerte QT_c-Zeit im Ruhe-EKG und die positive Familienanamnese insgesamt 4½ Punkte. Sie trägt somit ein hohes Risiko für ein LQTS. Die genetische Zieldiagnostik zeigte bei ihr einen positiven Mutationsnachweis. Die zwei anderen Schwestern der Indexpatientin T.W. und A.S. haben ebenfalls keine Vorerkrankungen und unauffällige körperlichen Untersuchungsbefunde. Die Ruhe-EKG-Ableitungen zeigten unauffällige Befunde mit einer normalen QT_c-Zeit bei T.W. und einer grenzwertigen QT_c-Zeit von 455 ms bei A.S. Beide erreichten im Diagnostik-Score 1½ Punkte für die positive Familienanamnese. Das entspricht einer geringen bis mittleren Wahrscheinlichkeit für ein LQTS. In der ergometrischen Untersuchung von T.W. wurde unter Beta-Blocker-Therapie eine QT_c-Zeit in Ruhe von 450 ms und während maximaler Belastung von 465 ms gemessen. Bei A.S. betrug die QT_c-Zeit unter Beta-Blocker Therapie in Ruhe 458 ms und während maximaler Belastung 450 ms. Sowohl bei A.S. als auch bei T.W. lag in der genetischen Zieldiagnostik ein positiver Befund vor. Bei den vier Familienmitgliedern der Kindergeneration bestehen weder Vorerkrankungen noch auffällige Ergebnisse in den Ruhe-EKG-Untersuchungen. In den ergometrischen Untersuchungen wurde bei S.B. eine QT_c-Zeit in Ruhe von 469 ms und während maximaler Belastung von 512 ms gemessen. Bei F.B. betrug die QT_c-Zeit in Ruhe 437 ms und während maximaler Belastung 411 ms.

Aufgrund des geringen Alters der Kinder S.W. und C.S. konnte keine ergometrische Untersuchung durchgeführt werden. Jedem Angehörigen der Kindergeneration wurden im Diagnostik-Score 1½ Punkte vergeben. Damit besteht für sie ebenfalls ein geringes bis mittleres Risiko für ein LQTS. Die genetische Zieldiagnostik zeigte bei der Tochter der Indexpatientin und beim Zwilling F.B. ein negatives und bei der Tochter von A.S. und dem Zwilling S.B. ein positives Ergebnis.

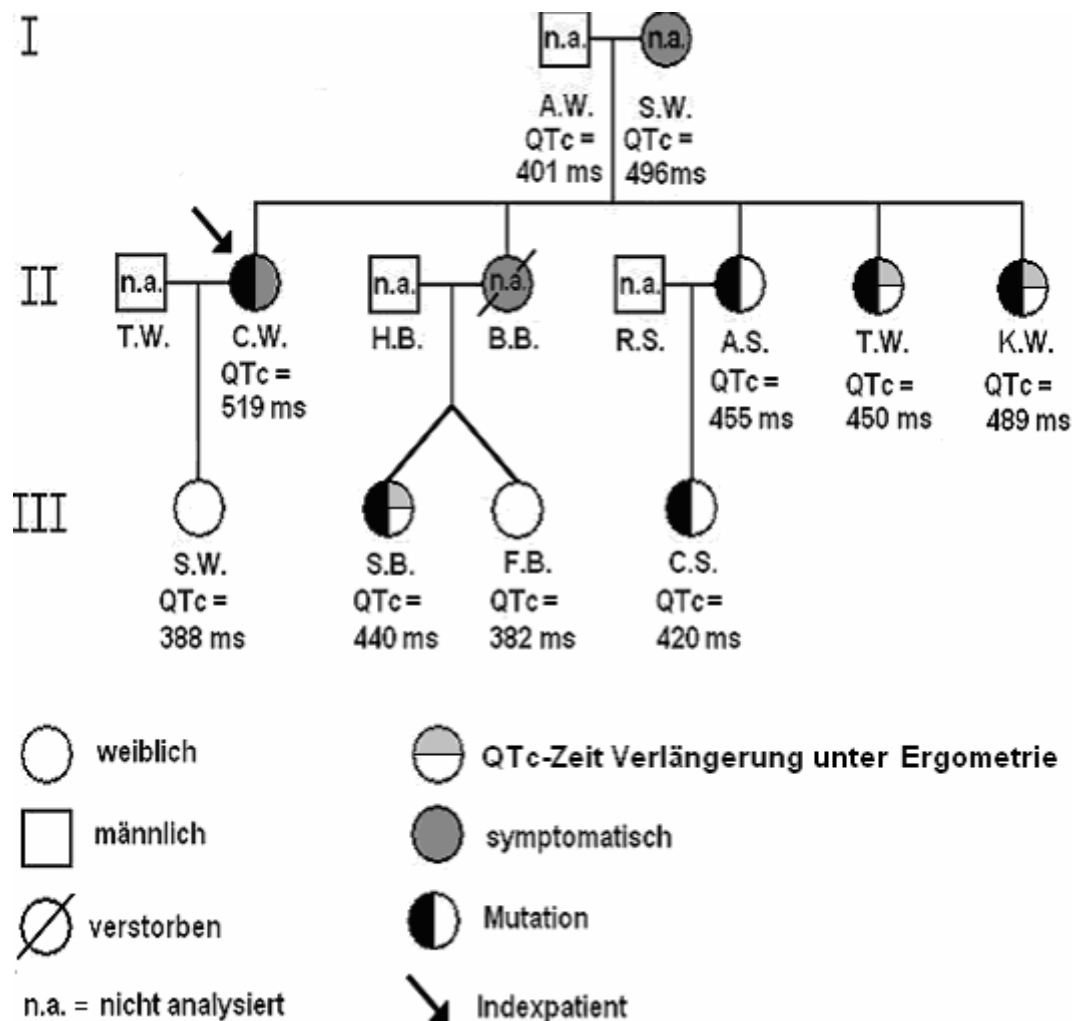


Abbildung 19: Familienstammbaum der Indexpatientin C.W. mit den entsprechenden QT_c-Zeiten. Die Elterngeneration ist mit I, die Generation der Indexpatientin mit II und die Kindergeneration mit III gekennzeichnet.

3.2.4 Funktionelle Charakterisierung

3.2.4.1 Funktionelle Expression der Mutation del185-187 im Gen KCNQ1

Für die Mutagenese der Mutation del185-187 im Gen KCNQ1 wurde der QuickChange®-XL site-directed mutagenesis Kit verwendet. Das so erzeugte Amplifikat konnte direkt zur Klonierung in kompetente E.coli Bakterien transformiert werden. Nach der Vermehrung in den kompetenten Bakterienkulturen erfolgten die Präparation der Plasmide und die Sequenzierung. Die Abbildung 21 zeigt die Fluoreszenzauswertungen der Sequenzierreaktion zur Kontrolle des Vorhandenseins der Mutation. Nach der erfolgreichen Verifizierung der Mutagenese durch die Sequenzierung erfolgte die Transfektion der GFP_{lre}-Vektoren in murine Fibroblastenzellen (LTK-Zellen).

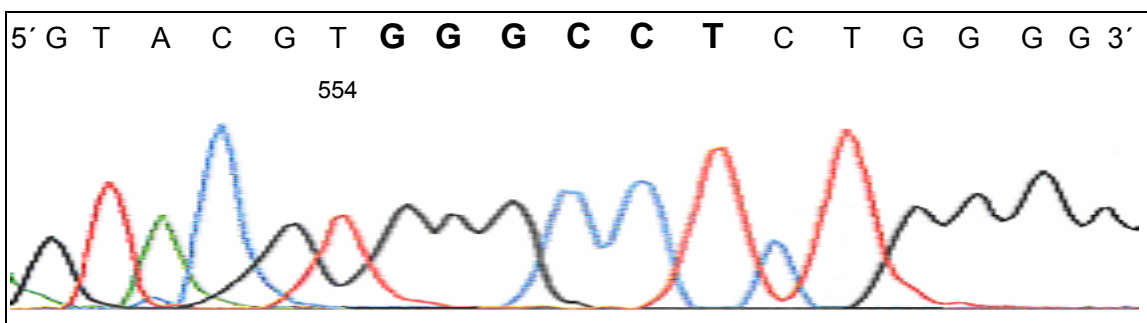


Abbildung 20: Fluoreszenzauswertung der Sequenzierreaktion des Wildtyp-Gens KCNQ1. Die fett gedruckten Buchstaben kennzeichnen die von der Deletion betroffenen Basen an Position 555 - 560.

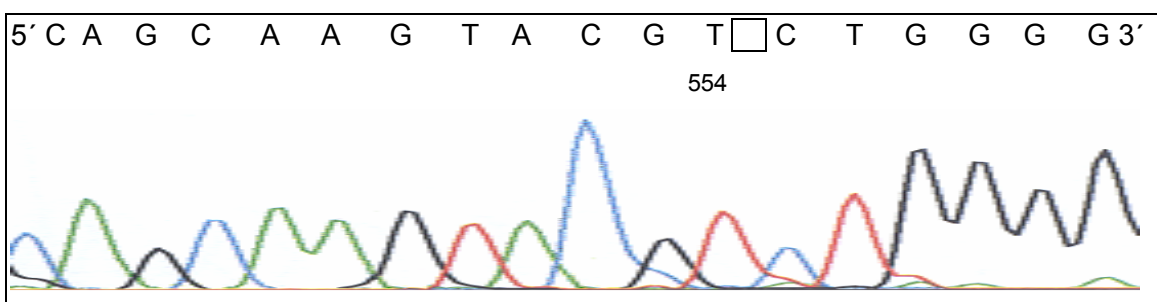


Abbildung 21: Fluoreszenzauswertung der Sequenzierreaktion der Mutation del185-187 im Gen KCNQ1. An den Positionen 555 - 560 des Codons (gekennzeichnet mit □) wurde eine Deletion erzeugt.

3.2.4.2 Elektrophysiologische Untersuchung der Mutation del185-187 im Gen KCNQ1

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung des Einflusses der Mutation del185-187 auf die Funktion der α -Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks} wurden mit der Patch-Clamp Technik die Membranströme der LTK-Zellen mit der exprimierten Mutation untersucht. Dabei wurden in allen Zellen durch depolarisierende Spannungssprünge zu Potentialen positiver als -30 mV auswärts rektifizierende Kaliumströme aktiviert. Zum Vergleich erfolgte die elektrophysiologische Messung mit der Patch-Clamp-Technik an LTK-Zellen mit dem exprimierten KCNQ1-Wildtyp.

Im Gegensatz zu den Zellen mit dem exprimierten Wildtyp konnten an den Zellen mit der exprimierten Mutation keine Stromkurven von I_{Ks} gemessen werden (Abb. 22).

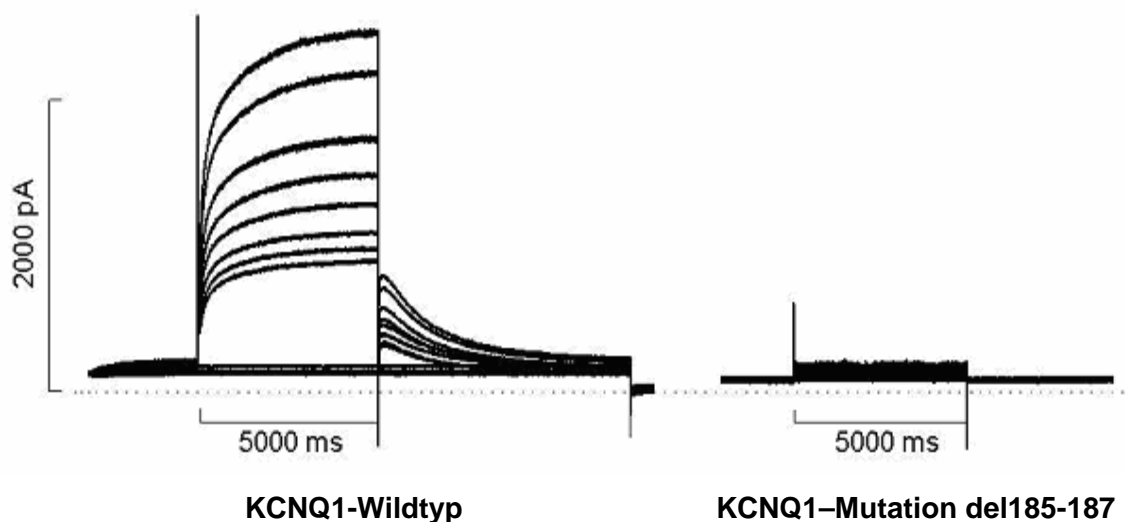


Abbildung 22: Kaliumeinwärtsstrom in LTK-Zellen mit dem KCNQ1-Wildtyp (links) und der KCNQ1-Mutation del185-187 (rechts). Dargestellt sind Serien von Stromkurven von I_{Ks} bei „voltage clamp“ Pulsen von -30 bis +80 mV in 10 mV Abständen.

3.3 Indexpatientin A.B. (LQT3)

3.3.1 Phänotypische Charakterisierung

3.3.1.1 Anamnese

Bei der Indexpatientin A.B. trat im Alter von 29 Jahren erstmalig ein nächtlicher Krampfanfall mit plötzlichem Herz-Kreislaufstillstand auf. Durch den Ehemann erfolgte zunächst eine Laienreanimation. Der eintreffende Notarzt konnte bei dokumentiertem Kammerflimmern eine erfolgreiche Defibrillation durchführen. Die Patientin hatte zu diesem Zeitpunkt keine kardialen Vorerkrankungen. Nach der stationären Aufnahme wurde in der Ruhe-EKG-Untersuchung eine deutlich verlängerte QT_c-Zeit gemessen. Die transthorakale Echokardiographie zeigte eine normale linksventrikuläre Pumpfunktion bei normal großen Herzhöhlen, ein grenzwertig verdicktes Septum und einen Mitralklappenprolaps mit spätsystolischer Mitralinsuffizienz. Aufgrund des überlebten plötzlichen Herztods und der deutlich verlängerte QT_c-Zeit wurde ein intrakardialer Defibrillator implantiert.

3.3.1.2 EKG-Diagnostik

Die Ruhe-EKG-Untersuchung ohne β -Blocker nach dem überlebten plötzlichen Herztod zeigte: regelmäßiger Sinusrhythmus, Herzfrequenz = 58/min, Mittellagetyt, Herzzeiten: PQ = 0,16 s, QRS = 0,08 s, RR = 1,05 s, QT = 0,51 s, QT_c = 0,498 s, keine Blockbildung, keine Hypertrophiezeichen, negatives T in II, III, aVF, V5-V6. Die T-Welle wies eine unauffällige monophasische, symmetrische Morphologie auf, T_{Wellenlänge-c} = 0,19 s, T-Wellenamplitude = 0,25 mV, QT_{onset-c} = 0,32 s, QT_{peak-c} = 0,41 s.



Abbildung 23: Ruhe-EKG der Indexpatientin A.B. mit Ableitung II und eingezeichneter QT-Strecken-Messung.

3.3.1.3 Diagnosestellung

Aufgrund der deutlich verlängerten QT_c-Zeit wurde zur Diagnosestellung eines LQTS der Diagnostik-Score nach Schwartz angewendet (vergleiche Seite 26 - 27):

EKG-Veränderungen:

zu A: Die QT_c-Zeit von maximal 498 ms in den Ruhe-EKG-Untersuchungen wurde mit 3 von 3 Punkten bewertet.

zu B: Es konnte zwar Kammerflimmern, aber keine Tachykardien vom Typ Torsades de Pointes dokumentiert werden (0 Punkte).

zu C / D: Es traten weder T-Wellen Alternationen noch gehöckerte T-Wellen auf (0 Punkte).

Klinische Ereignisse:

zu A / B: Anamnestisch sind bei der Patientin keine Synkopen bekannt und es besteht keine Taubheit (0 Punkte).

Familiäre Belastung:

zu A / B: In der Familienanamnese sind weder ein diagnostiziertes LQTS noch ein ungeklärter Todesfall vor dem 30. Lebensjahr bekannt (0 Punkte).

Die Gesamtpunktzahl im Diagnostik-Score nach Schwartz beträgt 3 Punkte. Damit hat die Patientin eine mittlere Wahrscheinlichkeit für ein LQTS (vergleiche Seite 27).

3.3.2 Genotypische Charakterisierung

Bei der Mutation, die bei der molekulargenetische Untersuchung der Indexpatientin A.B. identifiziert wurde, handelt es sich um eine Deletion an der Nucleotidposition 4850 - 4852 im Gen SCN5A. Von dieser Mutation sind zwei Basentriplets betroffen, ohne Verschiebung des Leserasters. Das Triplet TTC (Position 4849 - 4851) codiert die aromatische, unpolare und neutrale Aminosäure Phenylalanin und das Triplet TCC (Position 4852 - 4853) codiert die polare und neutrale Aminosäure Serin. Durch das Fehlen der drei Nucleotide T, C und T (Position 4850 - 4852) wird die Aminosäure Phenylalanin (Position 1617) nicht mehr codiert. Diese Deletions-Mutation befindet sich in der extrazellulären Region zwischen den transmembranären Segmenten 3 und 4 der Domäne IV des myokardialen Natriumkanals. Splawski et al. (2000) konnten die Mutation delF1617 in einer anderen Familie ebenfalls identifizieren.

In der molekulargenetischen Zieldiagnostik wurde bei R.L. keine Mutation und bei E.L. die gleiche Mutation wie bei der Indexpatientin identifiziert.

Der erstgeborene Sohn der Indexpatientin ist F.B. Er weist in der Anamnese keine Vorerkrankungen auf und die körperliche Untersuchung sowie die Laborwerte ergaben Normalbefunde. In der Ruhe-EKG-Untersuchung zeigten sich keine Auffälligkeiten, die QT_c-Zeit betrug 370 ms. Eine Langzeit-EKG-Untersuchung und eine echokardiographische Untersuchung waren ebenfalls unauffällig. Im Diagnostik-Score nach Schwartz wurde ein Punkt für die Diagnose eines LQTS in der Familie vergeben. Damit besteht bei F.B. ein niedriges Risiko für ein LQTS. Die Targetdiagnostik ergab bei ihm einen negativen Befund. Der zweite Sohn der Indexpatientin M.B. hat ebenfalls keine Vorerkrankungen, der körperliche Untersuchungsbefund, die Laborparameter und die Echokardiographie waren unauffällig. Im Ruhe-EKG wurde eine frequenzkorrigierte QT-Zeit von 457 ms gemessen, die übrigen Zeiten lagen im Normbereich. Im Diagnostik-Score nach Schwartz erreichte M.B. damit eine Gesamtpunktzahl von zwei. Das entspricht einer mittleren Wahrscheinlichkeit für ein LQTS. Die genetische Zieldiagnostik identifizierte bei ihm die gleiche Mutation wie bei seiner Mutter.

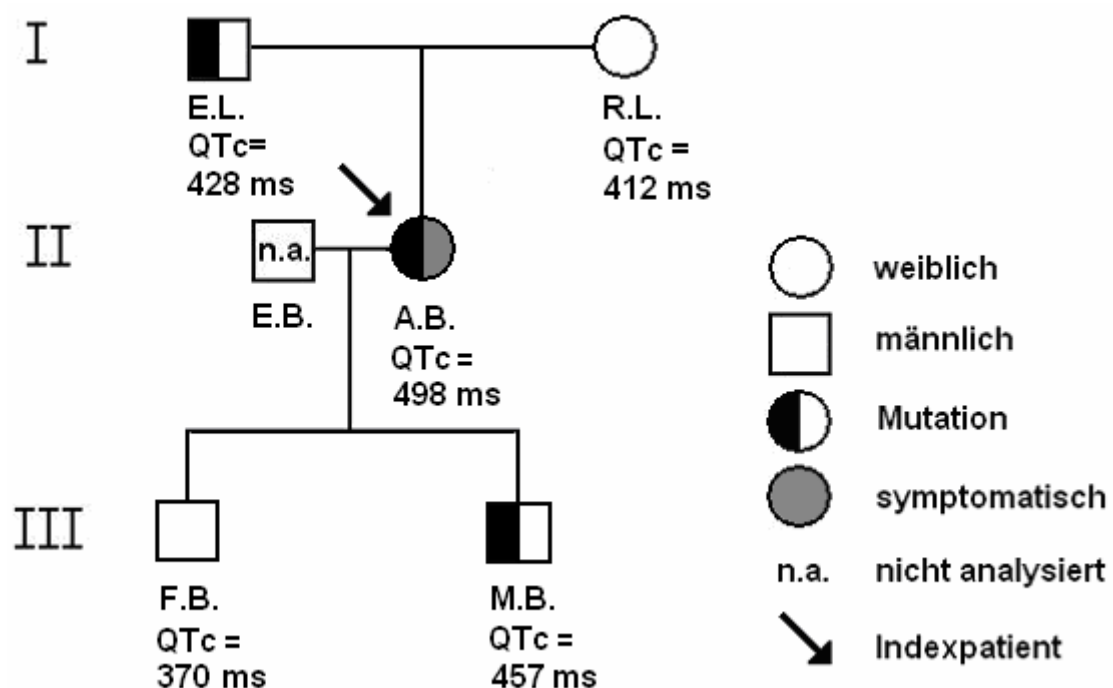


Abbildung 26: Familienstammbaum der Indexpatientin A.B. *I* kennzeichnet die Elterngeneration, *II* die Generation der Indexpatientin und *III* die Kindergeneration.

3.3.4 Funktionelle Charakterisierung

3.3.4.1 Funktionelle Expression der Mutation delF1617 im Gen SCN5A

Für die Mutagenese der Mutationen delF1617 im Gen SCN5A wurde wie für die Mutation del185-187 im Gen KCNQ1 der QuickChange®-XL site-directed mutagenesis Kit verwendet. Zur Kontrolle des Vorhandenseins der Mutation wurde nach der Vermehrung der Plasmide in kompetenten Zellen und der Preparation eine Sequenzierreaktion durchgeführt. Die Abbildung 28 zeigt die Fluoreszenzauswertung dieser Sequenzierreaktion. Nach positiver Identifizierung der Mutation in der Sequenzierreaktion, erfolgte die Transfektion der GFP_{lre}-Vektoren in humane embryonale Nierenzellen aus einer HEK-Zellreihe. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten anschließend diejenigen Zellen für die elektrophysiologischen Untersuchungen ausgewählt werden, die mit ihrem grünen Fluoreszenzsignal eine erfolgreiche Expression signalisierten.

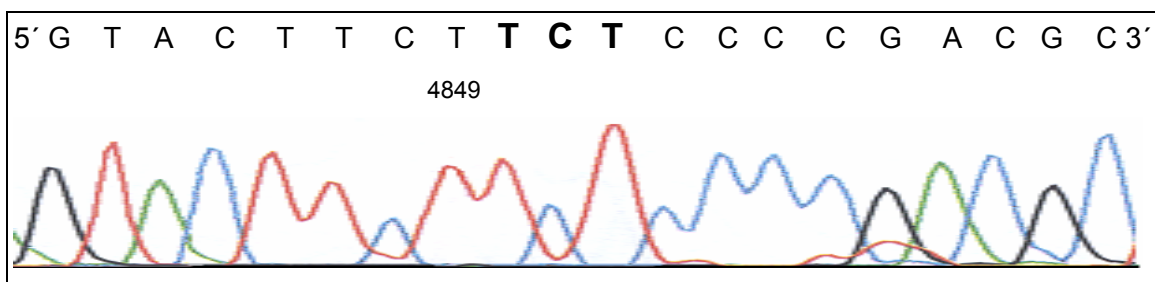


Abbildung 27: Fluoreszenzauswertung der Sequenzierreaktion des Wildtyp-Gens SCN5A mit entsprechender Basensequenz. Die fett gedruckten Buchstaben kennzeichnen die von der Deletion betroffenen Basen.

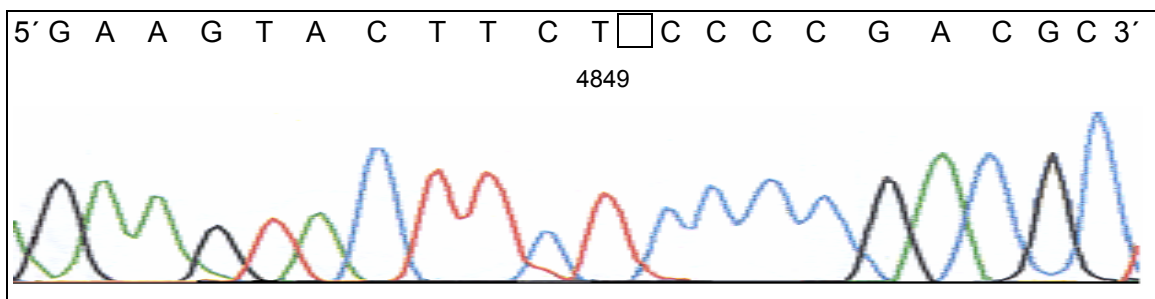


Abbildung 28: Fluoreszenzauswertung der Sequenzierreaktion der Mutation delF1617 im Gen SCN5A. An den Positionen 4850 - 4852 des Codons (gekennzeichnet mit) wurde eine Deletion erzeugt.

3.3.4.2 Elektrophysiologische Untersuchung der Mutation delF1617 im Gen SCN5A

Die Charakterisierung der Auswirkungen der Mutation delF1617 im Gen SCN5A auf die Funktion der α -Untereinheit des Natriumkanals erfolgte mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik. Es wurden vergleichende elektrophysiologische Untersuchungen an HEK-Zellen mit dem exprimierten SCN5A-Wildtyp und der exprimierten Genmutation durchgeführt. In Abbildung 29 sind die gemessenen Stromkurven von I_{Na} dargestellt. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten sich an den Zellen mit der exprimierten SCN5A-Mutation eine verzögerte Inaktivierung des Natriumkanals und eine geringe Reduktion der Amplitude des Natriumstromes (I_{Na}).

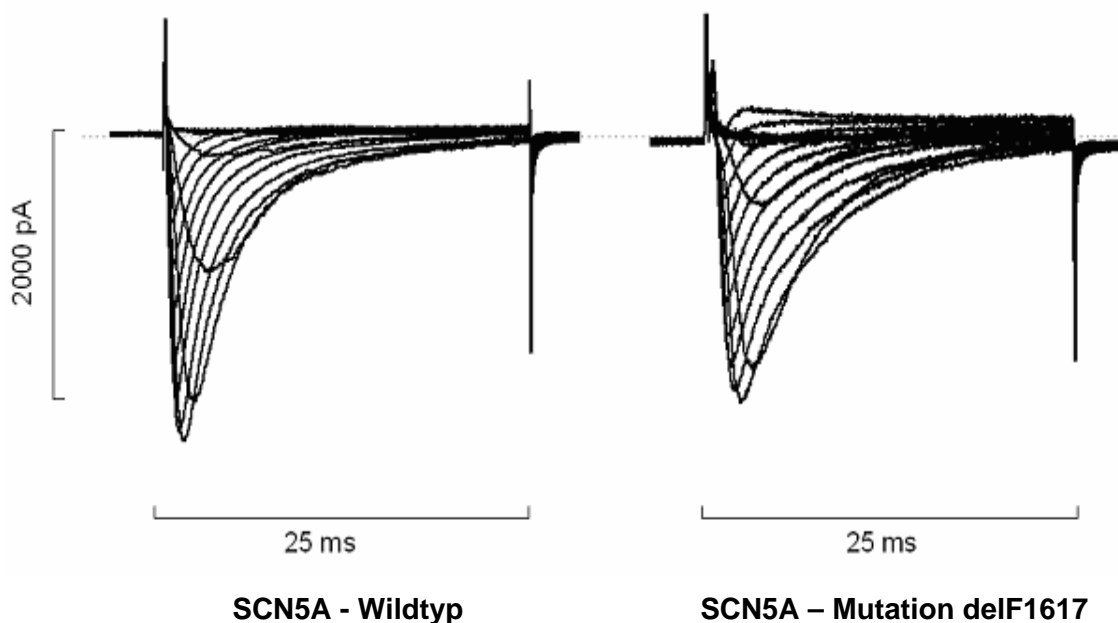


Abbildung 29: Natriumauswärtsstrom aus HEK-Zellen mit dem exprimierten SCN5A-Wildtyp (links) und der exprimierten SCN5A-Mutation delF1617 (rechts). Dargestellt sind Serien von Stromkurven von I_{Na} bei „voltage clamp“ Pulsen von -30 bis +80 mV in 10 mV Abständen.

3.4 Indexpatient A.K. (Brugada-Syndrom)

3.4.1 Phänotypische Charakterisierung

3.4.1.1 Anamnese

Im Alter von 37 Jahren hatte der Indexpatient A.K erstmals rezidivierende Synkopen, die auch in Ruhe auftraten. Im gleichen Jahr musste der Patient wegen eines plötzlichen Herz-Kreislaufstillstandes während eines Biergartenbesuches kardiopulmonal reanimiert werden. Im EKG wurden hämodynamisch wirksame, schnelle, polymorphe Kammertachykardien dokumentiert. Die Erstuntersuchung im Krankenhaus ergab einen unauffälligen körperlichen Befund und die Laborparameter lagen im Normbereich. In einer Rechts- und Linksherzkatheteruntersuchung wurde eine koronare Makroangiopathie, eine rechtsventrikuläre Dysplasie und bioptisch eine akute oder chronische Myokarditis sowie eine primäre Kardiomyopathie ausgeschlossen. Eine MRT-Aufnahme vom Herz zeigte ebenfalls einen unauffälligen Befund. In der elektrophysiologischen Untersuchung konnte durch Doppelstimulation im rechtsventrikulären Septum primäres Kammerflimmern induziert werden. Aus der Summe der Befunde ergab sich der Verdacht auf ein Brugada-Syndrom und die Indikation zur ICD-Implantation und β -Blocker-Therapie. Die Implantation erfolgte komplikationslos und der Patient blieb zunächst beschwerdefrei. Neun Monate nach der Implantation wurden durch den ICD rezidivierende ventrikuläre Tachykardien dokumentiert und es erfolgte während einer solchen Episode eine einmalige interne Defibrillation. Der Patient wurde anschließend intensivmedizinisch überwacht. Während des stationären Aufenthaltes wurde ein „VT-Sturm“ diagnostiziert, der mit intravenöser Kaliumsubstitution und einmaliger Gabe von Amiodaron terminiert werden konnte. Es erfolgte eine Therapie mit Kalium- und Magnesiumpräparaten und die β -Blocker-Therapie wurde abgesetzt. Ein halbes Jahr später wurden durch den ICD wiederholt Tachykardien dokumentiert und durch interne Defibrillationen terminiert. Eine medikamentöse Therapie mit Chinidin wurde begonnen. In einer elektrophysiologischen Kontroll-Untersuchung konnten keine Tachykardien oder Kammerflimmern ausgelöst werden. Seitdem hat der Patient keine erneuten defibrillationspflichtigen Episoden erlebt.

3.4.1.2 EKG-Diagnostik

Eine Ruhe-EKG-Untersuchung vier Tage nach dem Reanimationseignis zeigte: regelmäßiger Sinusrhythmus, HF = 75/min, Steillagetyt, angehobener J-Punkt, inkompletter Rechtsschenkelblock, keine Hypertrophiezeichen, Herzzeiten im Normbereich, im Verlauf fluktuierende nicht ischämietypische ST-Strecken-Hebungen in aVL, II, III, aVF, V1-V3. Bei einem medikamentösen Provokationstest mit 50 mg Ajmalin intravenös wurde eine Erhöhung des in Ruhe grenzwertig erhöhten ST-Abgangs in V1-V3 auf 0,4 mV festgestellt.

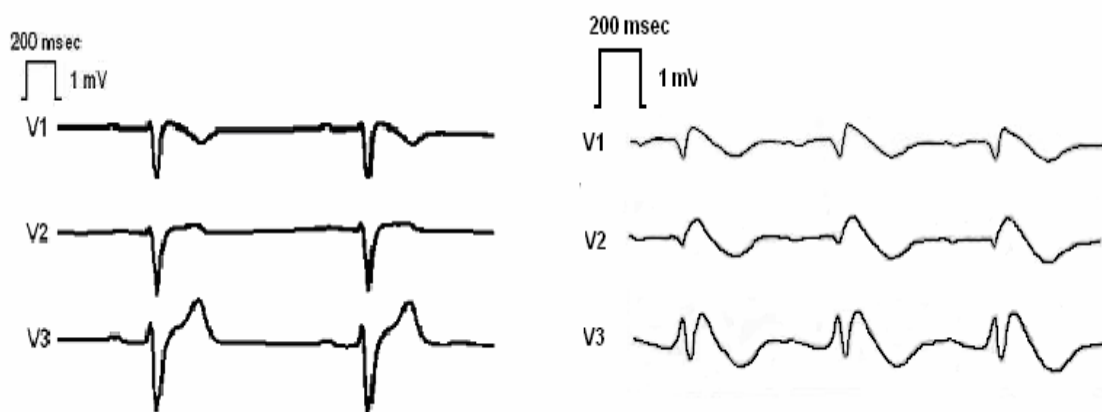


Abbildung 30: Ruhe-EKG (links) des Indexpatienten A.K. mit ST-Strecken-Hebungen in V1 - V3 und EKG nach medikamentösem Provokationstest (rechts) mit ST-Strecken-Hebungen in V1 - V3.

3.4.1.3. Diagnosestellung

Folgende Kriterien wurden für die Diagnosestellung Brugada-Syndrom gewertet (vergleiche Seite 28):

EKG-Veränderungen:

Im Ruhe-EKG zeigten sich ST-Strecken-Hebungen in den Ableitungen V1 - V3 und in einer elektrophysiologischen Untersuchung konnte durch Stimulation Kammerflimmern induziert werden.

Bei dem Patienten traten in der Vorgeschichte rezidivierende Synkopen auf und es wurden mehrmalig Episoden polymorpher Kammertachykardien dokumentiert.

Familiäre Belastung:

In der Familienanamnese ist kein Plötzlicher Herztod vor dem 45. Lebensjahr bekannt.

Nach den Empfehlungen der Arbeitsgruppe für Kardiale Arrhythmien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (2002) konnte bei dem Indexpatienten A.K. die Diagnose Brugada-Syndrom gestellt werden.

3.4.2 Genotypische Charakterisierung

Durch die molekulargenetische Untersuchung des Indexpatienten A.K. wurde die Substitutions-Mutation R878L an der Nucleotidposition 2633 im Gen SCN5A identifiziert. Durch die Mutation wird das Basentriplet CGC (Position 2632 - 2634) zu CTC verändert. Die aliphatische, neutrale und unpolare Aminosäure Leucin ersetzt dadurch die stark basische, positiv geladene und extrem polare Aminosäure Arginin (Position 878). Diese Mutation ist in der intrazellulären porenbildenden Region zwischen den transmembranären Segmenten 5 und 6 der Domäne II lokalisiert und wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

5' 3'

870 D S D S G L L P **R** W H M M D

2608 GAC AGC GAC TCA GGC CTG CTG CCT C**G**C TGG CAC ATG ATG GAC

intrazellulär

Abbildung 31: Sequenzausschnitt des Gens SCN5A nach Wang et al. (1996b). In der oberen Reihe ist die Aminosäuresequenz und in der unteren Reihe die Basensequenz des Sense-Stranges dargestellt, jeweils codiert durch die international verwendeten Buchstaben. Die von der Substitution betroffene Base (Position 2633) und die entsprechende Aminosäure (Position 878) sind mit □ gekennzeichnet. Unterhalb der Sequenzen steht die Tertiärstruktur des Proteins.

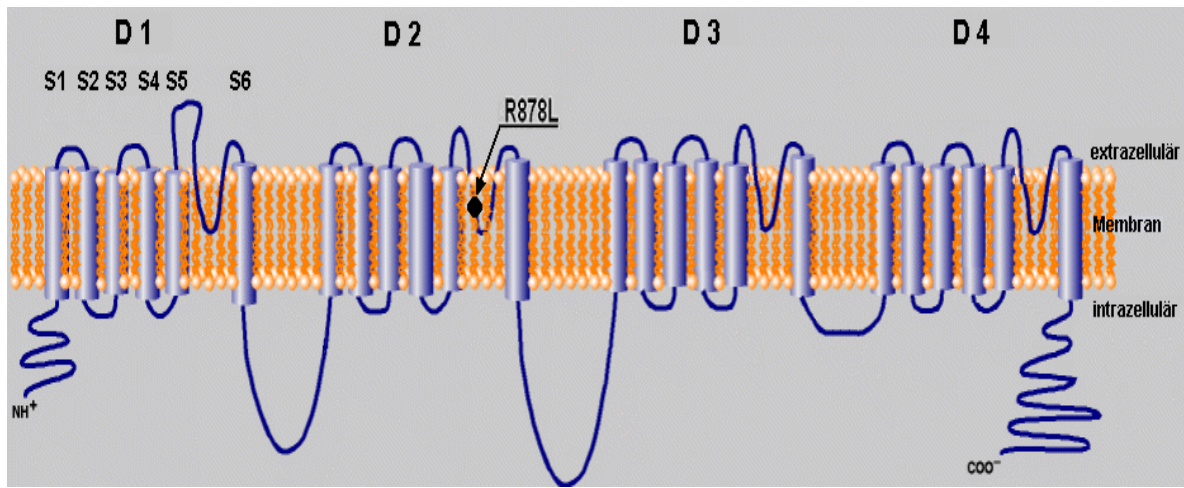


Abbildung 32: Schematische Darstellung des myokardialen Natriumkanals (nach L.A. Larsen, LQTS Database). D 1 bis D 4 bezeichnen die vier Domänen und S1 bis S6 die jeweiligen transmembranären Segmente. Der schwarze Punkt kennzeichnet die Position der identifizierten Mutation R878L.

3.4.3 Familienanamnese

Zu den Familienmitgliedern des Indexpatienten gehören die Mutter E.K. und der Vater F.K. Die Familienanamnese von A.K. ist bezüglich eines rhythmologischen Geschehens unauffällig, beide Eltern zeigen unauffällige elektrokardiographische Untersuchungsergebnisse. Die Targetdiagnostik zeigte für den Vater F.K. ein positives und für die Mutter E.K. ein negatives Ergebnis.

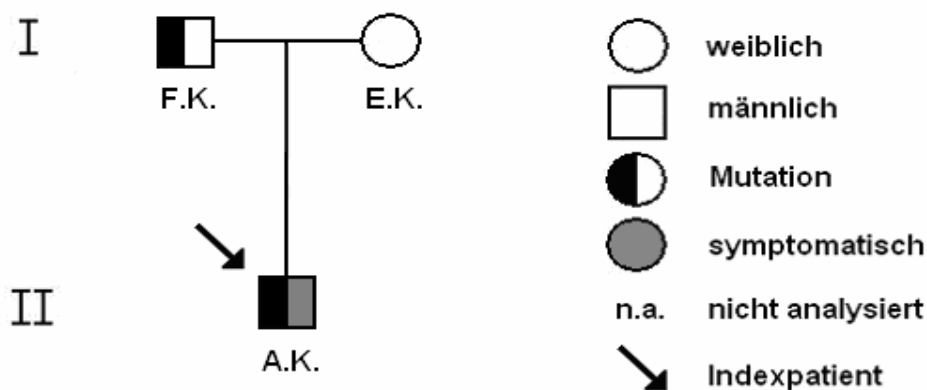


Abbildung 33: Familienstammbaum des Indexpatienten A.K. Die Elterngeneration ist mit I und Generation des Indexpatienten mit II gekennzeichnet.

3.4.4 Funktionelle Charakterisierung

3.4.4.1 Funktionelle Expression der Mutation R878L im Gen SCN5A

Zur Erzeugung der Mutation R878L im Gen SCN5A wurde ebenfalls der QuickChange®-XL site-directed mutagenesis Kit verwendet. Die positive Identifizierung der Mutation erfolgte nach der Vermehrung der Plasmide in kompetenten Zellen und der Preparation durch eine Sequenzierreaktion (siehe Abbildung 35).

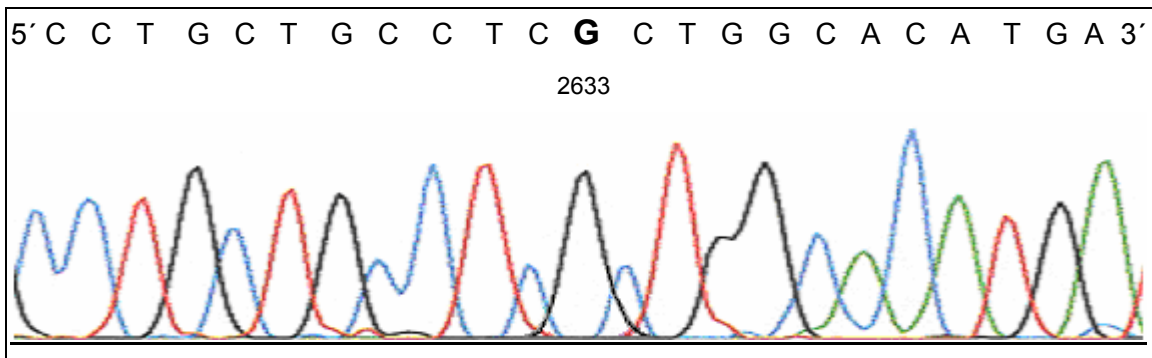


Abbildung 34: Fluoreszenzauswertung der Sequenzierreaktion des Wildtyp-GenSCN5A. Die von der Substitution betroffene Base Guanin (G) ist fett gedruckt.

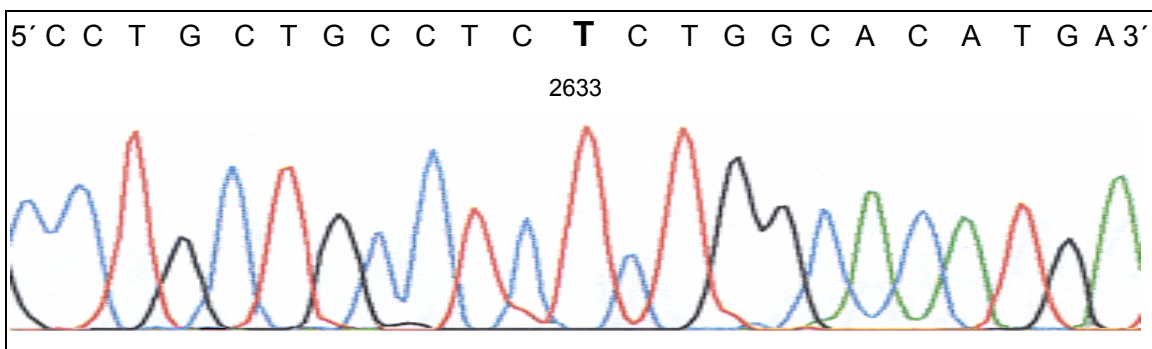


Abbildung 35: Fluoreszenzauswertung der Sequenzierreaktion der Mutation R878L im Gen SCN5A. An der Stelle 2633 des Codons wurde die Base Guanin gegen Thymin (T) ausgetauscht.

3.4.4.2 Elektrophysiologische Untersuchung der Mutation R878L im Gen SCN5A

Die elektrophysiologische Charakterisierung der Mutation R878L im Gen SCN5A wurde mit der Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten vergleichend an Zellen mit dem exprimierten SCN5A-Wildtyp und an Zellen mit der exprimierten Mutation. Wie in der Abbildung 36 dargestellt, konnten an den HEK-Zellen mit der exprimierten Mutante keine Stromkurven von I_{Na} gemessen werden.

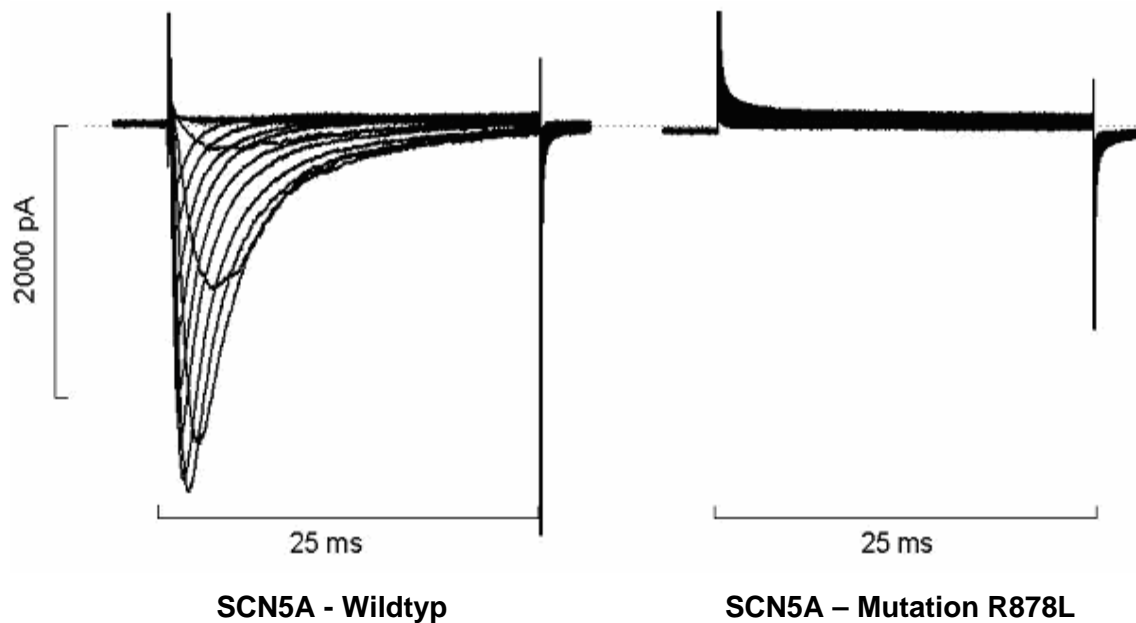


Abbildung 36: Natriumauswärtsstrom an HEK-Zellen mit exprimiertem SCN5A-Wildtyp (links) und exprimierter SCN5A-Mutation R878L (rechts). Dargestellt sind Serien von Stromkurven von I_{Na} bei „voltage clamp“ Pulsen von -30 bis +80 mV in 10 mV Abständen.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die phänotypische Gemeinsamkeit der vier Indexpatienten liegt in dem Ereignis überlebter plötzlicher Herztod ohne Hinweis für eine strukturelle Herzerkrankung. Bei drei Indexpatienten zeigte sich im EKG eine verlängerte QT_c-Zeit. Diesen drei Patienten wurden bei klinischem Verdacht auf ein LQTS im Schwartz-Score Punkte zugeteilt. Zwei Indexpatienten erreichten einen Punktwert von drei und haben damit eine mittlere Wahrscheinlichkeit für ein LQTS, ein Indexpatient erreichte fünfeinhalb Punkte und trägt damit eine hohe Wahrscheinlichkeit für ein LQTS. Die molekulargenetischen Untersuchungen identifizierten bei jedem Indexpatienten mit klinischem Verdacht auf ein LQTS jeweils eine Mutation in den untersuchten Krankheitsgenen. Insgesamt wurden dreizehn Familienangehörige der Indexpatienten mit LQTS klinisch untersucht. Bei jedem wurde eine Diagnosestellung nach dem Schwartz-Score durchgeführt. Drei Familienangehörige wiesen eine geringe Wahrscheinlichkeit, acht eine mittlere Wahrscheinlichkeit und zwei eine hohe Wahrscheinlichkeit für ein LQTS auf. Von den dreizehn klinisch untersuchten Familienangehörigen stimmten elf einer genetischen Zieldiagnostik zum Nachweis der Mutation des entsprechenden Indexpatienten zu. Sieben Familienangehörige hatten ein positives Ergebnis in der Zieldiagnostik, vier ein negatives Ergebnis.

Der vierte Indexpatient mit überlebtem plötzlichen Herztod wies in der Vorgeschichte rezidivierende Synkopen auf und zeigte im EKG einen inkompletten Rechtsschenkelblock sowie unter medikamentöser Provokation präkordiale ST-Streckenhebungen. In der elektrophysiologische Untersuchung konnte Kammerflimmern induziert werden. Unter Anwendung der aktuellen Empfehlungen zur Diagnosestellung wurde bei ihm ein Brugada-Syndrom diagnostiziert. Die molekulargenetische Untersuchung identifizierte bei diesem Patienten eine Mutation im Gen SCN5A und bestätigte die klinische Diagnose. Keiner der beiden Familienangehörigen des Indexpatienten mit Brugada-Syndrom zeigte Auffälligkeiten in der Vorgeschichte oder in der EKG-Untersuchung. Bei einem der beiden untersuchten Familienangehörigen konnte in der Targetdiagnostik eine Mutation nachgewiesen werden.

Die elektrophysiologische Charakterisierung der expremierten Mutationen im Zellsystem zeigte bei den beiden LQT1-Mutationen keine messbaren Stromkurven, was einer „loss of function“-Mutation entspricht. Die elektrophysiologische Untersuchung der LQT3-Mutation zeigte eine verzögerte Inaktivierung des Natriumkanals und damit eine „gain of function“-Mutation. An den Zellen mit der expremierten SCN5A-Mutation des Patienten mit Brugada-Syndrom konnten die Messungen keine Stromkurve von I_{Na} nachweisen („loss of function“).

Index-patient	Phänotypische Charakterisierung	Genotypische Charakterisierung	Funktionelle Charakterisierung
M.P.	QT _c = 543 ms, Kammerflimmern, überlebter plötzlicher Herztod bei Stress, 3 Punkte im Schwartz-Score = mittlere Wahrscheinlichkeit für ein LQTS	LQT1 T322A im Gen KCNQ1	Keine Stromkurven von I _{Ks} messbar („loss of function“)
C.W.	QTc = 519 ms, Torsades de Pointes - Episode, Synkopen, überlebter plötzlicher Herztod in Ruhe, 5½ Punkte im Schwartz-Score = hohe Wahrscheinlichkeit für ein LQTS	LQT1 del185-187 im Gen KCNQ1	Keine Stromkurven von I _{Ks} messbar („loss of function“)
A.B.	QTc = 498 ms, Kammerflimmern, überlebter plötzlicher Herztod im Schlaf, 3 Punkte im Schwartz-Score = mittlere Wahrscheinlichkeit für ein LQTS	LQT3 del F1617 im Gen SCN5A	Verzögerte Inaktivierung des Natriumkanals („gain of function“)
A.K.	ST-Strecken-Hebungen in V1-V3, Synkopen, überlebter plötzlicher Herztod in Ruhe	Brugada-Syndrom R878L im Gen SCN5A	Keine Stromkurven von I _{Na} messbar („loss of function“)

Tabelle 4 zeigt für jeden Indexpatienten die Ergebnisse der phänotypischen, genotypischen und funktionellen Charakterisierung.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Phänotypische Charakterisierung

Die klinische Diagnosestellung der vier Indexpatienten basierte auf der Eigenanamnese, der Familienanamnese und den charakteristischen Veränderungen in den elektrokardiographischen Untersuchungen. Nach ihrem überlebten plötzlichen Herztod wurden die vier Indexpatienten zunächst in unterschiedlichen Kliniken betreut. Die Ableitungen der Elektrokardiogramme, die im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet wurden, erfolgten daher nicht unter standardisierten Bedingungen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Bezug auf den überlebten plötzlichen Herztod. In Studien konnten für LQTS-Patienten sowohl eine erhöhte Heterogenität von QT_c-Zeitwerten zu unterschiedlichen Messzeitpunkten, als auch eine erhöhte QT-Dispersion nachgewiesen werden (Day et al. 1990; Chiang et al., 2000). Eine standardisierte Durchführung der EKG-Ableitung zu definierten Zeitpunkten in Bezug auf das Reanimationsereignis könnte bei LQTS-Patienten eine arithmetische Mittlung der für die Diagnose LQTS verwendeten QT_c-Zeit ermöglichen und eine vorhandene Dynamik der QT_c-Zeitveränderungen verdeutlichen.

Bei dem Indexpatienten M.P. (LQT1) und bei fünf Familienangehörigen der Indexpatientin C.W. (LQT1) wurde zur Untersuchung der belastungsinduzierten QT_c-Zeitveränderungen eine Fahrrad-Ergometrie durchgeführt. Bisher existieren jedoch zum körperlichen Belastungstest bei LQT1-Patienten keine etablierten Standards und seine prädiktive Aussagekraft wurde noch nicht in großen prospektiven Studien untersucht. Die vorliegenden Untersuchungen und die zugrunde liegende Pathophysiologie zeigen die diagnostische Bedeutung des Belastungs-EKGs mit inadäquater Verkürzung beziehungsweise pathologischer Verlängerung des QT_c-Intervalls vor allem für LQT1-Patienten.

Die Erhebung der genauen Umstände des überlebten plötzlichen Herztodes jedes Indexpatienten erfolgte an Hand der verfügbaren Notarztprotokolle, Arztbriefe und Beobachtungen anwesender Personen. Obwohl diese Dokumentationen nicht standardisiert erfolgten, wurde auf die Ausarbeitung genotyp-hinweisender Unterschiede der Begleitumstände (Ruhe oder Anstrengung) und Trigger (laute Geräusche) geachtet.

Zur Diagnosestellung eines LQTS wurde der Punkte-Score nach Schwartz verwendet, mit dessen Hilfe eine individuelle Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines LQTS errechnet werden kann (Schwartz et al., 1993). Dieser Index ist aktuell die einzige etablierte Zusammenstellung LQTS-spezifischer Symptome. Sensitivität und Spezifität wurden für den Schwartz-Score bisher aber in keiner größeren Studie prospektiv untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass der Schwartz-Score nur eingeschränkt für die klinische Diagnosestellung eines LQTS zu verwenden ist. Dabei ist zu berücksichtigen, dass dieser klinische Score in einer Zeit der Registrierdaten entwickelt wurde, als eine genetische Diagnostik als „Gold-Standard“ noch nicht möglich war. Auch genotypenweisende elektrokardiographische Unterschiede wie sie von Moss et al. (1995) beschrieben wurden, finden im Schwartz-Score keine Anwendung. So zeigte der Indexpatient M.P. eine LQT1-hinweisende T-Wellenmorphologie mit verlängerter $T_{\text{Wellenlänge-c}}$ -Zeit und die Indexpatientin A.B. eine LQT3-hinweisende verlängerte $QT_{\text{onset-c}}$ -Zeit. Trotz dieser elektrokardiographischen Hinweise auf das Vorliegen einer ursächlichen Mutation wurde für beide Indexpatienten im Diagnostik-Score nach Schwartz lediglich eine mittlere Wahrscheinlichkeit für ein LQTS ermittelt. Zudem kann aus der berechenbaren Wahrscheinlichkeit eines LQTS kein Rückschluss auf das individuelle Risiko für kardiale Ereignisse gezogen werden, da dieses Risiko für die einzelnen Unterformen signifikante Unterschiede aufweist (Priori et al., 2003, Zareba et al. 2003). Entsprechend den Studien von Priori et al. (2003) zur Risikostratifizierung beim LQTS bestand für die beiden Indexpatienten M.P. und C.W. ein hohes (>50 %) Risiko für ein erstes kardiales Ereignis vor dem 40. Lebensjahr. Diese Risikoeinstufung wurde durch den überlebten plötzlichen Herztod für M.P. und C.W. bestätigt. Bei dem Indexpatienten M.P. widerspricht jedoch die hohe Risikoeinstufung für ein kardiales Ereignis der errechneten mittleren Wahrscheinlichkeit für ein LQTS im Diagnostik-Score nach Schwartz und verdeutlicht somit dessen eingeschränkte Aussagekraft.

Für insgesamt vierzehn Patienten erfolgte in der vorliegenden Arbeit anhand des Diagnostik-Scores nach Schwartz die Wahrscheinlichkeitsberechnung für ein LQTS. Bei den drei hochsymptomatischen Indexpatienten variiert die erreichte Punktezahl zwischen drei und fünfeinhalb, trotz genetisch gesicherter Diagnose. Bei den elf untersuchten Familienangehörigen konnte die Diagnose LQTS in sieben Fällen genetisch gesichert werden. Der Schwartz-Score bei diesen Patienten variierte zwischen einem und viereinhalb Punkten. Die erreichten Punktesummen der vier genetisch nicht betroffenen Familienangehörigen variierten zwischen eins und eineinhalb. Trotz der geringen Fallzahl wird die Limitation des Diagnostik Scores nach Schwartz sowohl bei den hochsymptomatischen Indexpatienten, als auch deren wenig

symptomatischen oder asymptomatischen Familienangehörigen deutlich. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der für symptomatische Patienten entwickelte Schwarz-Score nicht auf asymptomatische Mutationsträger (die zum Beispiel bei Familienuntersuchungen identifiziert wurden) angewendet werden kann.

An Hand der aktuellen Empfehlungen der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie wurde bei einem der Indexpatienten die Diagnose Brugada-Syndrom gestellt. Anders als im Diagnostik-Score für das LQTS werden die Symptome nicht mit Punkten bewertet, sondern nach Haupt- und Nebenkriterien geordnet. Auch diese Systematik von Symptomen zur Diagnosestellung erlaubt keine Aussagen über das individuelle Risiko für kardiale Ereignisse.

Die Aussagekraft der vorliegenden Arbeit wurde durch die eingeschränkte Kooperation einiger Familienangehöriger der Indexpatienten limitiert. Einige Angehörige lehnten sowohl eine ausführliche Anamnese-Erhebung als auch eine Ruhe-EKG-Untersuchung ab. Dadurch sind die Stammbäume der Indexpatienten zum Teil unvollständig. Nur bei den Familienangehörigen der Indexpatient C.W. (LQT1) konnten Belastungs-EKG-Untersuchungen durchgeführt werden. Die Angehörigen des Indexpatienten M.P. (LQT1) lehnten diese Untersuchung leider ab. Auch die Familienangehörigen des Indexpatienten A.B. (Brugada-Syndrom) stimmten weiterführenden Untersuchungen, wie elektrophysiologische Testung oder pharmakologische Provokation, nicht zu.

4.1.2 Genotypische Charakterisierung

Als molekulargenetische Grundlage des LQTS wurden bisher Mutationen auf insgesamt sieben Kandidatengenen identifiziert. Zur Bestimmung des Genotyps der drei Indexpatienten mit klinischem Verdacht auf LQTS wurden in der vorliegenden Arbeit die Gene KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1 und KCNE2 komplett sequenziert, da auf diesen Genen 75-85 % der bisher identifizierte Mutationen beim LQTS lokalisiert waren (Übersicht in Moss und Kass, 2005).

Die molekulargenetische Untersuchung der Familienangehörigen der Indexpatienten beschränkte sich auf eine so genannte Zieldiagnostik. Dabei wird nur dasjenige Exon sequenziert, in dem beim Indexpatienten die Mutation nachgewiesen wurde. Eventuell vorhandene Mutationen in anderen Genbereichen oder anderen Kandidatengenen können durch die Zieldiagnostik nicht erfasst werden. Molekulargenetische Studien identifizierten bei 5 – 8 % der Patienten mit LQTS mehr als eine Mutation in den Krankheitsgenen und konnten nachweisen, dass diese Patienten längere QT_c-Zeiten und eine größere Inzidenz für kardiale Arrhythmien als Patienten mit einer einzelnen

identifizierten Mutation aufweisen (Westenskow et al., 2004, Schwartz et al., 2003). Aus diesem Grund muss für Indexpatienten eine Komplettssequenzierung der häufigsten Kandidatengene angestrebt werden, selbst wenn in der Sequenzanalyse des ersten Exons/Gens bereits eine Mutation identifiziert wurde. Dies wird aus Kostengründen in der Praxis häufig nicht so durchgeführt und erschwert die systematische Analyse zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation.

Beim Brugada-Syndrom gilt SCN5A bisher als einziges Krankheitsgen. Zur Bestimmung des Genotyps des Indexpatienten mit Brugada-Syndrom wurde daher das Gen SCN5A komplett sequenziert. Da bisher bei zirka 80 % der Patienten mit Brugada-Syndrom keine genetische Ursache gefunden wurde, ist zu erwarten, dass in Zukunft weitere Kandidatengene für das Brugada-Syndrom identifiziert werden. Zudem ist der kausale Zusammenhang zwischen identifizierten SCN5A-Mutationen und der Krankheitsausprägung durch den Nachweis von modifizierenden Genen weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen.

4.1.3 Funktionelle Charakterisierung

4.1.3.1 PCR - Mutagenese

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Hypothese, dass Mutationen in den Ionenkanalgenen die Funktionen der Kanalproteine verändern und damit ursächlich verantwortlich sind für die Entstehung der lebensbedrohlichen Rhythmusstörungen beim LQTS und beim Brugada-Syndrom. Durch die funktionelle Expression der identifizierten Mutationen in einem geeigneten Expressionsmodell und die elektrophysiologische Charakterisierung der expremierten Ionenkanäle wurde die Korrelation von Genotyp und Phänotyp untersucht. Dazu konnten mit Hilfe der PCR-Technik geeignete gentechnische Methoden zur gezielten Veränderung der Wildtyp DNA-Sequenz (gerichtete DNA-Mutagenese = site-directed-mutagenesis) etabliert werden. Die Mutagenese von T322A im Gen KCNQ1 erfolgte mit Hilfe der Overlap-Extension-PCR-Methode. Der Vorteil dieser Methode besteht in der unmittelbaren Erfolgskontrolle der einzelnen PCR-Schritte durch die gelelektrophoretische Analyse der Amplifikate und der Möglichkeit, jeden Zwischenschritt unmittelbar optimieren zu können. Der Nachteil besteht in dem großen Zeitaufwand und dem Verlust an Amplifikatmenge durch die Aufreinigungs- und Trennungsschritte. Nachdem die Mutagenese von T322A im Gen KCNQ1 mit der Overlap-Extension-PCR Methode gezeigt hatte, dass diese Technik sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist, wurde für die

Mutation del185-187 im Gen KCNQ1 der Quick Change®-XL site-directed mutagenesis Kit verwendet. Beim Versuch, die Methode der Overlap-Extension-PCR zur Mutagenese des Gens SCN5A anzuwenden zeigte sich, dass die Genlänge bei dieser PCR-Technik eine limitierende Rolle spielt. Es konnten zwar die jeweiligen Teilamplifikate erzeugt werden, jedoch gelang es nicht, diese in der Fusions-PCR zu amplifizieren. Zudem war zu vermuten, dass durch die verschiedenen PCR-Schritte in Genen mit großer Länge selbst durch Polymerasen mit Proof-Reading-Eigenschaften, wie die verwendete Pfu-Polymerase, Fehler eingebaut werden. Daher erfolgten die Mutagenesen von F1617 und R878L im Gen SCN5A ebenfalls mit dem Quick Change®-XL site-directed mutagenesis Kit.

4.1.3.2 Vektoren und Zellmodelle

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Expression der mutierten Gene GFP-Ire-Vektoren verwendet. Der Vorteil dieser Vektoren besteht in einer kodierenden Sequenz für ein grün leuchtendes Protein (GFP), die der Multiple-Cloning-Site (MCS) vorangestellt ist. Bei erfolgreicher Expression des Vektors können transfizierte Zellen anhand ihrer grünen Farbe unter einem Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden. Diese Methode erlaubt aber keine Rückschlüsse darüber, ob bei fehlendem Nachweis eines Stromes durch die elektrophysiologische Untersuchung ursächlich ein Defekt der Kanalfunktion, eine fehlerhafte Expression des Kanalproteins oder Störungen des intrazytoplasmatischen Kanalprotein-Transfers („trafficking“-Defekte) vorliegen. Zur genauen Lokalisation der mutierten Ionenkanäle sind daher Vektoren erforderlich, die das grün fluoreszierende Protein und das mutierte Gen als Fusionsprotein exprimieren. Das Ionenkanalprotein wird dabei an einen Farbstoff gebunden, der eine visuelle Lokalisation unter dem Fluoreszenzmikroskop ermöglicht. Dadurch lassen sich Aussagen darüber treffen, ob das Protein in die Zellmembran eingebaut wird oder im Zytoplasma verbleibt.

Als Zellmodelle für die funktionellen Expressionen wurden für die identifizierten KCNQ1-Mutationen LTK-Zellen und für die identifizierten SCN5A-Mutationen HEK-Zellen verwendet. Die Vorteile der jeweils verwendeten Zell-Linien bestehen in der fehlenden Expression zelleigener Kalium- bzw. Natriumkanäle und der relativ einfachen molekularbiologischen und elektrophysiologischen Handhabung. Die Nachteile sind in der fehlenden Übertragbarkeit der elektrophysiologischen Untersuchungsergebnisse auf Kardiomyozyten zu sehen. Mögliche Einflüsse der Mutationen auf myokardspezifische intrazelluläre Prozesse konnten nicht berücksichtigt werden.

4.1.3.3 Elektrophysiologische Untersuchungen

Der große Nachteil elektrophysiologischer Messungen an Einzelzellen besteht in der fehlenden Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Funktion im Zellverband. Sowohl das Brugada-Syndrom als auch das Romano-Ward-Syndrom sind autosomal dominante Erkrankungen. Daher wird angenommen, dass im myokardialen Zellverband der Patienten mutierte Kanäle und Wildtyp-Kanäle nebeneinander existieren und sich gegenseitig beeinflussen. Die myokardialen Kaliumkanäle I_{Ks} und I_{Kr} werden durch ein Tetramer aus vier Untereinheiten gebildet. Jede dieser Untereinheiten wird dabei durch ein einzelnes Gen kodiert und kann von einer Mutation betroffen sein. In Co-Expressionsstudien mit mutierten Kanälen und Wildtyp-Kanälen konnte gezeigt werden, dass einzelne Mutationen in den Genen KCNQ1 und HERG zu einem dominant-negativen Effekt führen. Dabei wird angenommen, dass eine einzelne mutierte Untereinheit im Tetramer auch die Funktion der Wildtyp-Untereinheiten beeinflussen kann (Priori et al., 1999). Daher muss grundsätzlich bei Mutationen mit einem potentiell dominant-negativen Effekt mit einem schwereren Phänotyp gerechnet werden. Dieser Effekt wird unabhängig von der Coexpression mit der jeweiligen β -Untereinheit beobachtet (Shalaby et al., 1997). Für Mutationen in Natriumkanälen wurden in Co-Expressionsstudien modulierende Effekte durch Polymorphismen nachgewiesen (Baroudi et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden die identifizierten Mutationen zur Etablierung der verwendeten Methoden zunächst in einem Single-Expressionsmodell untersucht. Dabei zeigten sich sowohl ein vollständiger Funktionsverlust (T322A und del185-187 im Gen KCNQ1, R878L im Gen SCN5A), als auch eine Funktionsänderung („gain of function“) im Sinne einer verzögerten Inaktivierung (F1617 im Gen SCN5A). Aus diesen Ergebnissen der elektrophysiologischen Untersuchungen konnten zwar erste Rückschlüsse auf veränderte Kanaleigenschaften gezogen werden, jedoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen nicht abschließend geklärt. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig. Zum Nachweis eines möglichen dominant-negativen Effekts der identifizierten Kaliumkanal-Mutationen müssen Co-Expressionsstudien von Mutante und Wildtyp-Gen erfolgen. Auch um die physiologischen Interaktionen zwischen porenbildenden und regulatorischen Untereinheiten zu berücksichtigen, sind Co-Expressionsstudien erforderlich.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Indexpatient M.P. (LQT1)

Die klinischen Symptome des Indexpatienten M.P. unterscheiden sich von denen der anderen Patienten durch das frühe Auftreten und die Umstände des ersten kardialen Ereignisses. Als Einziger der drei untersuchten Indexpatienten mit LQTS ereignete sich sein Reanimationseignis in der Kindheit und während einer Situation mit körperlicher Anstrengung. Diese Umstände legten den Verdacht auf ein LQT1 nahe, da körperliche Anstrengung, insbesondere Schwimmen, als relativ spezifischer Trigger für das LQT1 gilt und die Wahrscheinlichkeit für ein erstes kardiales Ereignis in der Kindheit beim LQT1 höher ist als beim LQT2 und LQT3 (Schwartz et al., 2001, Zareba et al., 2003). Im Kontext von sportlicher Aktivität musste M.P. bei dokumentiertem Kammerflimmern kardiopulmonal reanimiert werden. Bei der Diagnosestellung nach den Kriterien des Schwartz-Scores konnte trotz der Schwere der Klinik lediglich die deutlich verlängerte QT_c-Zeit im EKG gewertet werden, da als dokumentierte Arrhythmien nur Tachykardien vom Typ Torsades de Pointes gelten (Schwartz et al., 1993). Damit bestand bei M.P. eine mittlere Wahrscheinlichkeit für ein LQTS. In der elektrokardiographischen Untersuchung zeigte sich aber außer einer verlängerten QT_c-Zeit auch eine breitbasige T-Wellenmorphologie mit einer verlängerten T_{Wellenlänge-c}-Zeit, welche hinweisend sein kann für ein LQT1 (Moss et al., 1995). In der Belastungs-EKG-Untersuchung konnte zudem während der maximalen Belastung eine deutliche Zunahme der in Ruhe verlängerten QT_c-Zeit dokumentiert werden. Takenaka et al. (2003) konnten in einer Studie nachweisen, dass im Unterschied zu gesunden Kontrollpersonen und LQT2-Patienten bei LQT1-Patienten eine signifikante QT_c-Zeit Verlängerung während körperlicher Belastung auftritt. Somit muss die errechnete Wahrscheinlichkeit für ein LQTS bei dem Indexpatienten M.P. relativiert werden, da andere Symptome, als die im Diagnostik-Score nach Schwartz erfassten, auf einen ursächlich genetischen Defekt deuten. In der molekulargenetischen Untersuchung wurde dieser Sachverhalt durch die Identifikation der Mutation T322A im Gen KCNQ1 bestätigt und damit bei dem Indexpatienten M.P. ein LQT1 diagnostiziert. Nach den Studien von Priori et al. (2003) bestand bei ihm ein hohes Risiko (> 50 %) für ein erstes kardiales Ereignis vor dem 40. Lebensjahr ohne Therapie. Diese Risikoeinstufung wurde durch den überlebten plötzlichen Herztod bestätigt und widerlegt die Wahrscheinlichkeitsaussage des Schwartz-Scores.

Für die Mutter I.P. konnte die errechnete geringe Wahrscheinlichkeit für ein LQTS im Schwartz-Score durch das negative Ergebnis der genetischen Zieldiagnostik bestätigt werden. Der Vater W.P. hatte keine kardialen Vorerkrankungen und im EKG wurde bei ihm eine grenzwertig verlängerte QT_c-Zeit gemessen. Im Diagnostik-Score nach Schwartz bestand für ihn ebenfalls eine niedrige Wahrscheinlichkeit für ein LQTS. Die genetische Zieldiagnostik identifizierte bei W.P. allerdings die gleiche Mutation wie bei seinem Sohn M.P. Damit liegt bei W.P. ein LQT1 vor und die Wahrscheinlichkeitsberechnung im Schwartz-Score war nicht zutreffend. Zareba et al. (2003) konnten für LQT1-Patienten nachweisen, dass die QT_c-Zeit bei Kindern (< 16. Lebensjahr) signifikant länger war, als bei Erwachsenen. Somit lässt sich vermuten, dass die grenzwertig verlängerte QT_c-Zeit bei W.P. in der Kindheit deutlich verlängert gewesen sein könnte und damit eine höhere Wahrscheinlichkeit für ein LQTS im Schwartz-Score bestand. Seine Risikoeinstufung für ein erstes kardiales Ereignis vor dem 40. Lebensjahr von weniger als 30 % nach Priori et al. (2003) wurde durch die bisher unauffällige Klinik bestätigt. Für die identifizierte Mutation T322A im Gen KCNQ1 konnten somit in der Familie des Indexpatienten M.P. zwei unterschiedliche Phänotypen nachgewiesen werden: überlebter plötzlicher Herztod und deutlich verlängerte QT_c-Zeit, sowie unauffällige Klinik und grenzwertig verlängerte QT_c-Zeit. Die Mutation T322A ist im Gen KCNQ1 in der extrazellulären Region der porenbildenden alpha-Untereinheit des myokardialen Kaliumkanals I_{Ks} zwischen der Pore und dem intrazellulären Segment 6 lokalisiert. Die bisher identifizierten benachbarten Mutationen wiesen einen milderen LQTS-Phänotyp ohne Fälle von plötzlichem Herztod auf (Donger et al., 1997). Die elektrophysiologischen Untersuchungsergebnisse der exprimierten Mutation T322A zeigten einen vollständigen Funktionsverlust der alpha-Untereinheit des myokardialen Ionenkanals I_{Ks}. Zum Teil könnte dieser funktionelle Effekt durch die Lokalisation der identifizierten Mutation erklärt werden. Aufgrund der extrazellulären Lage in unmittelbarer Nachbarschaft zur Pore wäre ein direkter Einfluss auf die Porenfunktion und eine veränderte Interaktion der extrazellulären Region mit Signalmolekülen möglich. Zudem könnte ein dominant-negativer Effekt der identifizierten Mutation die Klinik von M.P. im Vergleich zu den milderen Phänotypen der benachbarten Mutationen erklären. Dieser Effekt wurde aber in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Der gleichzeitige Nachweis der Mutation T322A im Gen KCNQ1 bei dem Indexpatienten M.P. und seinem bisher asymptomatischen Vater relativiert die Kausalität Genotyp und Phänotyp dieser Mutation.

4.2.2 Indexpatientin C.W. (LQT1)

Die Indexpatientin C.W. unterscheidet sich von den zwei anderen Patienten mit LQTS durch die dokumentierten Torsades de Pointes - Tachykardien, dem Auftreten rezidivierender Synkopen in der Vorgeschichte und einem ungeklärten Todesfall vor dem 30. Lebensjahr in ihrer Familie und erzielte im Diagnostik-Score nach Schwartz die höchste Gesamtpunktzahl. Die Diagnose einer Epilepsie in ihrer Kindheit und Jugend muss rückblickend kritisch bewertet werden, da die Krampfanfälle möglicherweise im Zusammenhang mit zerebralen Ischämien in Folge selbstterminierender, hämodynamisch wirksamer Torsades de Pointes - Tachykardien zu werten sind. Aufgrund der erreichten Punktezahl im Diagnostik-Score nach Schwartz bestand für C.W. eine hohe Wahrscheinlichkeit für ein LQTS. In der elektrokardiographischen Untersuchung konnten zudem eine LQT1-spezifische breitbasige T-Wellenmorphologie und eine LQT1-spezifische verlängerte $T_{\text{Wellenlänge c-Zeit}}$ nachgewiesen werden. Das Auftreten des plötzlichen Herztodes in Ruhe ist allerdings untypisch für ein LQT1 (Schwartz et al., 2001). Das molekulargenetische Untersuchungsergebnis der Indexpatientin C.W. bestätigte durch die Identifikation der Mutation del185-187 im Gen KCNQ1 sowohl die klinische Diagnose des Schwartz-Scores als auch die LQT1-hinweisenden EKG-Veränderungen. Auch die Einschätzung ihres Risikos für ein erstes kardiales Ereignis vor dem 40. Lebensjahr von mehr als 50 % nach Priori et al. (2002) war zutreffend.

Von den sieben untersuchten Familienmitgliedern der Indexpatientin C.W. konnte bei fünf Mitgliedern in der Zieldiagnostik dieselbe Mutation nachgewiesen werden. Bei vier dieser Familienangehörigen wurde im Diagnostik-Score nach Schwartz aufgrund der familiären Belastung und normalen QT_c -Zeit im EKG eine geringe bis mittlere Wahrscheinlichkeit für ein LQTS errechnet, bei einer Familienangehörigen bestand aufgrund der deutlich verlängerten QT_c -Zeit eine hohe Wahrscheinlichkeit. Den zwei Angehörigen mit negativem Ergebnis in der Zieldiagnostik wurden im Schwartz-Score aufgrund der familiären Belastung und der normalen QT_c -Zeit im EKG eine geringe bis mittlere Wahrscheinlichkeit zugeordnet. Die Aussagen des Schwartz-Scores waren somit in drei von sieben Fällen zutreffend. In vier Fällen wurde die errechnete Wahrscheinlichkeit für ein LQTS durch die genetische Diagnostik widerlegt. Ursache für diese eingeschränkte Aussagekraft des Schwartz-Scores bei den Familienangehörigen der Indexpatientin C.W. ist die geringe Penetranz klinischer Symptome in dieser Familie. Lediglich bei einem von fünf Familienmitgliedern mit nachgewiesener Mutation

lag eine verlängerte QT_c-Zeit in der Ruhe-EKG-Untersuchung vor und keiner war bisher symptomatisch. Bei zwei der drei untersuchten asymptomatischen Mutationsträgern mit normalen QT_c-Zeiten zeigte das Belastungs-EKG allerdings eine deutliche Verlängerung der QT_c-Zeiten während maximaler Belastung. Diese Symptomatik ist hinweisend auf einen Defekt im myokardialen Kaliumkanal I_{Ks}, denn Studien zeigten spezifisch für LQT1-Patienten im Unterschied zu gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit anderen LQTS-Formen eine signifikante QT_c-Zeit-Verlängerung während und kurz nach körperlicher Belastung (Swan et al., 1999; Takenaka et al., 2003). Somit konnten für diese asymptomatischen Familienmitglieder ebenfalls eine funktionelle Bedeutung der identifizierten Mutation nachgewiesen werden. Die klinische Penetranz der identifizierten Mutation del185-187 im Gen KCNQ1 beträgt in der Familie der Indexpatientin C.W. 33 % und liegt deutlich unter der durchschnittlichen Penetranz klinischer Symptome für das LQTS von 90 % (Priori et al., 1999). Die nachgewiesene Expressivität der Mutation umfasst in dieser Familie Patienten mit unauffälliger Vorgeschichte und normaler QT_c-Zeit, Patienten mit unauffälliger Vorgeschichte und verlängerter QT_c-Zeit und eine klinisch auffällige Patientin mit deutlich verlängerter QT_c-Zeit. Am Beispiel der Familie von C.W. wird das Problem der Genotyp-Phänotyp Korrelation bei angeborenen Arrhythmiesyndromen deutlich. In wieweit modifizierende genetische und / oder Umwelteinflüsse gewertet werden müssen ist Gegenstand aktueller Forschung.

Die identifizierte Mutation del185-187 im Gen KCNQ1 ist im intrazellulären Bereich der porenbildenden alpha-Untereinheit des myokardialen Kaliumkanals I_{Ks} zwischen den Segmenten 2 und 3 lokalisiert. In der Nachbarschaft der Mutation del185-187 wurden bisher die Mutationen Y184S und G189 in der Literatur beschrieben. Die identifizierte Substitutionsmutation Y184S wurde klinisch nicht näher charakterisiert (Jongbloed et al., 1999, Splawski et al., 2000). Bei heterozygoten Patienten mit der Insertionsmutation G189 wurden Symptome des Romano-Ward-Syndroms (verlängerte QT_c-Zeit, Synkopen und Fälle von plötzlichem Herztod) und bei einem homozygoten Patienten Symptome des Jervell-Lange-Nielson-Syndroms (verlängerte QT_c-Zeit und angeborene Taubheit) beschrieben (Splawski et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnten die elektrophysiologischen Untersuchungen der funktionell exprimierten Mutation del185-187 einen vollständigen Funktionsverlust der alpha-Untereinheit des Kaliumkanals I_{Ks} nachweisen. Die Deletionsmutation könnte ursächlich zu einer Strukturveränderung des Ionenkanals führen. Ob es sich bei del185-187 im Gen KCNQ1 um eine Mutation mit dominant-negativem Effekt handelt, wurde nicht untersucht.

4.2.3 Indexpatientin A.B. (LQT3)

Für die Indexpatientin A.B. wurde im Diagnostik-Score nach Schwartz aufgrund der deutlich verlängerten QT_c-Zeit im EKG eine mittlere Wahrscheinlichkeit für ein LQTS errechnet. Genotypinweisende Symptome bei der Indexpatientin A.B. fanden aber im Score keine Anwendung und relativieren die Aussage zur Wahrscheinlichkeit eines LQTS. So stellt das Auftreten ihres plötzlichen Herztodes während des Schlafens eine typische Situation für kardiale Ereignisse bei LQT3-Patienten dar (Schwartz et al., 2001). In der elektrokardiographischen Untersuchung konnte bei der Indexpatientin A.B. zudem eine LQT3-hinweisende verlängerte QT_{onset-c}-Zeit nachgewiesen werden (Moss et al., 1995). Die molekulargenetische Untersuchung bestätigte den klinischen Verdacht für das Vorliegen eines LQT3 und identifizierte bei A.B. eine Mutation im Gen SCN5A. Somit konnte mit dem Schwartz-Score trotz des ausgeprägten Phänotyps der Indexpatientin keine zutreffende Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines LQTS berechnet werden. Auch die mittlere (30 – 49 %) Risikoeinstufung für ein erstes kardiales Ereignis vor dem vierzigsten Lebensjahr nach Priori et al. (2002) wurde durch den überlebten Herztod der Indexpatientin A.B. relativiert.

Für die Eltern der Indexpatientin und den Sohn F.B. bestand im Diagnostik-Score nach Schwartz eine geringe Wahrscheinlichkeit für ein LQTS. Für den Sohn M.B. wurde aufgrund der verlängerten QT_c-Zeit im EKG eine mittlere Wahrscheinlichkeit für ein LQTS errechnet. Das Ergebnis des Schwartz-Scores konnte in der molekulargenetischen Zieldiagnostik bei dem Vater der Indexpatientin und dem Sohn M.B. durch einen positiven Mutationsnachweis widerlegt werden. Wie in der Familie der Indexpatientin C.W. zeigte der Diagnostik-Score nach Schwartz bei klinisch unauffälligen Mutationsträgern mit normaler oder gering verlängerter QT_c-Zeit eine eingeschränkte Aussagekraft.

Die identifizierte Mutation delF1617 ist in der extrazellulären Region zwischen den transmembranären Segmenten 3 und 4 der Domäne IV des myokardialen Natriumkanals lokalisiert. In der Nachbarschaft von delF1617 wurden bisher die Mutationen T1620M in der extrazellulären Region zwischen den Segmenten 3 und 4, sowie die Mutation R1623Q im transmembranären Segment 4 diagnostiziert (Chen et al., 1998, Kambouris et al. 1998). Patienten mit der Mutation T1620M zeigen Brugada-Syndrom-typische Symptome und Patienten mit der Mutation R1623Q Symptome des LQTS. Obwohl die Mutationen delF1617 und T1620M beide in der extrazellulären Region zwischen den transmembranären Segmenten 3 und 4 der Domäne IV lokalisiert

sind, unterscheiden sich ihre phenotypischen Charakteristika deutlich voneinander. Für die Mutation R1623Q im transmembranären Segment 4 konnten Makita et al. (1998) hingegen ähnliche elektrophysiologische Untersuchungsergebnisse nachweisen wie die vorliegende Arbeit für die Mutation delF1617. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass allein die unmittelbare Nähe einer identifizierten Mutation im Gen SCN5A zu bekannten und funktionell charakterisierten Mutationen keine Diagnose zulässt. Deshalb ist die funktionelle Charakterisierung vor allem bei identifizierten SCN5A-Mutationen notwendig, um bei asymptomatischen oder wenig symptomatischen Patienten die Diagnose zu sichern.

Elektrophysiologische Studien zeigten, dass LQT3 assoziierte Mutationen den Inaktivierungsprozess betroffener Natriumkanäle stören. Dadurch können während der Plateauphase einige myokardiale Natriumkanäle nicht inaktiviert sein, sondern einen sehr kleinen depolarisierenden Strom erzeugen, der zu einer Verlängerung der Repolarisationsphase führt (Kass et al., 2003). Dieser Effekt wurde auch in der vorliegenden Arbeit in der elektrophysiologischen Untersuchung der exprimierten SCN5A-Mutation del F1617 nachgewiesen. Dabei zeigten die gemessenen Stromkurven von I_{Na} eine verzögerte Inaktivierung des Natriumkanals. Dieses Ergebnis könnte die nachgewiesene deutlich verlängerte QT_c - und $QT_{onset-c}$ -Zeit der Indexpatientin A.B. erklären.

4.2.4 Indexpatient A.K. (Brugada-Syndrom)

Bei dem Indexpatienten A.K. wurde aufgrund der typischen klinischen Symptome und entsprechend den aktuellen Empfehlungen die Diagnose Brugada-Syndrom gestellt (Antzelevitch et al., 2005). Neben dem Hauptkriterium, durch Natriumkanal-Blocker (Ajmalin) provozierte ST-Strecken-Hebungen in mehr als einer rechtspräkordialen Ableitung, konnten zusätzlich die Nebenkriterien dokumentierte polymorphe Kammer-tachykardien, rezidivierende Synkopen und elektrophysiologische Induzierbarkeit nachgewiesen werden. Das Ergebnis der molekulargenetischen Untersuchung bestätigte die klinische Diagnose Brugada-Syndrom durch den Nachweis der Substitutions-Mutation R878L im Gen SCN5A. Priori et al. (2002) wiesen in einer retrospektiven Studie für Brugada-Syndrom-Patienten mit Synkopen in der Vorgeschichte und ST-Strecken-Hebungen im EKG ein hohes Risiko für einen plötzlichen Herztod nach. Diese Risikoeinstufung wurde durch den überlebten plötzlichen Herztod von A.K. bestätigt.

Die Eltern des Indexpatienten A.K. hatten keine kardialen Vorerkrankungen und zeigten elektrokardiographische Normalbefunde. Die molekulargenetische Targetdiagnostik ergab für die Mutter E.K. ein negatives und für den Vater E.K. ein positives Ergebnis. Die Identifikation der Mutation R878L im Gen SCN5A bei dem bisher asymptomatischen Vater F.K. bestätigt Studienergebnisse, die 23 - 30 % asymptomatischen Mutationsträger unter den Familienangehörigen von Brugada-Syndrom-Patienten nachweisen konnten (Priori et al., 2002; Smits et al., 2002). In ihrer Studie zur Risikostratifizierung beim Brugada-Syndrom zeigten Priori et al. (2002), dass der Nachweis einer Mutation im Gen SCN5A für Patienten mit Brugada-Syndrom nicht mit einem erhöhten Risiko für kardiale Ereignisse assoziiert ist. Somit besteht für den Vater F.K. trotz des Mutationsnachweises lediglich ein geringes Risiko für ein kardiales Ereignis – solange er ein unauffälliges EKG aufweist.

Die Mutation R878L ist in der porenbildenden Region des myokardialen Natriumkanals zwischen den transmembranären Segmenten 5 und 6 der Domäne II lokalisiert. In der Literatur wurden bisher in der Nachbarschaft die Mutationen L867X, S871del9X und F892I beschrieben (Schulze-Bahr et al., 2003; Priori et al., 2002). Alle drei Mutationen sind ebenfalls in der porenbildenden Region der Domäne II lokalisiert und zeigen den Phänotyp des Brugada-Syndroms.

In den elektrophysiologischen Untersuchungen der exprimierten SCN5A-Mutation R878L konnte ein vollständiger Funktionsverlust des Natriumkanals nachgewiesen werden. Diese Untersuchungsergebnisse bestätigen andere Expressionsstudien mit bisher identifizierten Mutationen von Patienten mit Brugada-Syndrom, in denen sowohl eine fehlende Expression der Natriumkanäle als auch eine herabgesetzte Funktion der mutierten Kanäle im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen wurde (Antzelevitch et al., 2001, Baroudi et al., 2002). Als Folge dieser Störungen kann eine Imbalance zwischen Kalium-Auswärtsstrom und Natrium-Einwärtsstrom und damit eine räumlichen Inhomogenität des Aktionspotentials mit ST-Strecken-Hebungen im EKG resultieren (Yan et al., 1996, Antzelevitch et al., 1998). Die elektrophysiologische Charakterisierung der Mutation R878L korreliert daher mit den beschriebenen EKG-Veränderungen (ST-Strecken-Hebungen) des Indexpatienten A.K. und ist vereinbar mit der Diagnose Brugada-Syndrom. Der gleichzeitige Nachweis der identifizierten Mutation bei einem bisher asymptomatischen Familienangehörigen relativiert auch in diesem Fall die Kausalität von Phänotyp und Genotyp.

4.3. Korrelation von Phänotyp und Genotyp

Bei allen vier Indexpatienten konnten die molekulargenetischen und elektrophysiologischen Untersuchungen einen kausalen Zusammenhang zwischen spezifischen EKG-Veränderungen, ursächlicher Mutation und elektrophysiologischen Charakteristika nachweisen. Bei jedem Indexpatienten wurden aber auch Familienangehörige identifiziert, die zwar Träger der identifizierten Mutationen des verwandten Indexpatienten sind, aber einen unauffälligen oder deutlich mildereren Phänotyp aufweisen.

Aktuell ist der Diagnostik-Index nach Schwartz die einzige etablierte Systematik zur klinischen Diagnosestellung des LQTS. Einschließlich der drei Indexpatienten, wurde in der vorliegenden Arbeit bei insgesamt sechzehn Personen der Schwartz-Score zur Diagnosestellung eines LQTS verwendet. Die errechnete Wahrscheinlichkeiten für ein LQTS im Schwartz-Score stimmte nur bei 5 der 16 Patienten (31 %) mit dem molekulargenetischen Untersuchungsergebnis genau überein. Selbst bei zwei Indexpatienten mit überlebtem plötzlichen Herztod und deutlich verlängerter QT_c-Zeit errechnet der Schwartz-Score lediglich eine mittlere Wahrscheinlichkeit für ein LQTS. Damit wurde eine eingeschränkte Aussagekraft des Schwartz-Scores nachgewiesen. Als eine Ursache konnte die geringe Penetranz bestimmter Mutationen identifiziert werden. Daher sollte eine molekulargenetische Untersuchung für jeden Patienten mit klinischem Verdacht auf ein LQTS und jedem seiner Familienangehörigen erfolgen (Priori et al., 1999). Trotz der fehlenden oder mildereren phänotypischen Präsentationen der identifizierten Mutationen bei den Familienangehörigen der Indexpatienten mit LQTS oder Brugada-Syndrom könnte aufgrund der elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Mutationen für die betroffenen Patienten ebenfalls ein erhöhtes Risiko für den plötzlichen Herztod bestehen. In den aktuellen Publikationen zur Risikostratifizierung für Patienten mit LQTS oder Brugada-Syndrom wurden aber elektrophysiologische Charakteristika identifizierter Mutationen bisher nicht berücksichtigt (Priori et al., 2002; 2003). Für Patienten mit Brugada-Syndrom wurde in retrospektiven Studien sogar das Vorliegen einer Mutation als Prediktor für einen Herzstillstand ausgeschlossen (Priori et al., 2003).

Aus der breiten klinischen Heterogenität derselben Mutation, wie sie für die Familie der Indexpatientin C.W. dargestellt werden konnte, muss die Existenz modifizierender Faktoren geschlussfolgert werden. Einige dieser modifizierenden Faktoren für das LQTS und das Brugada-Syndrom wurden bereits identifiziert. So konnte der Einfluss

von Alter und Geschlecht auf den Phänotyp beim LQTS in Studien nachgewiesen werden. Zum Beispiel scheint das Risiko eines kardialen Ereignisses beim LQT1 während der Kindheit für Jungen größer zu sein als für Mädchen (Zareba et al., 2003). Auch in der vorliegenden Arbeit trat ein erstes kardiales Ereignis bei dem männlichen Indexpatienten mit LQT1 früher auf als bei der weiblichen Indexpatientin mit LQT1, obwohl ihre funktionell exprimierten Mutationen beide einen vollständigen Funktionsverlust des Kaliumkanals aufwiesen. Ihre Klinik zeigte aber deutliche Unterschiede hinsichtlich der Umstände des plötzlichen Herztodes, dem Vorkommen von Synkopen und der Familienanamnese. Die Unterschiede in Mutationsart und -lokalisierung könnten hierfür die Ursache sein. Mutationen in der Nachbarschaft von T322A und del185-187 zeigten wiederum sowohl einen ähnlichen, als auch einen deutlich milderen Phänotyp. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass andere Faktoren einen Einfluss auf die phänotypische Ausprägung einer Mutation beim LQTS ausüben als die unterschiedlichen Arten und Lokalisationen identifizierter Mutationen. Für LQT1-Patienten wurde diese Schlussfolgerung durch Zareba et al. (2003) in einer großen retrospektiven Studie bestätigt, in der nachgewiesen wurde, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit unterschiedlichen Mutationslokalisationen im Gen KCNQ1 bezüglich klinischer Ereignisse und den EKG-Parametern bestehen. Beim LQT3 konnten modulierende Effekte auf verschiedene Mutationen der α -Untereinheit des myokardialen Natriumkanals durch die β -Untereinheit und den weit verbreiteten Polymorphismus H558R im Gen SCN5A nachgewiesen werden (Valdivia et al., 2002, Makielski et al., 2003).

4.4 Empfehlungen zur Untersuchung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei LQTS und Brugada-Syndrom

Bei kongenitalen Arrhythmiesyndromen, wie dem LQTS und dem Brugada-Syndrom, können die krankheitstypischen Symptome eines Betroffenen lediglich eine klinische Verdachtsdiagnose liefern. Für die Diagnosesicherung ist daher die molekulargenetische Untersuchung unverzichtbar. Ob es sich jedoch bei der identifizierten Mutation um eine kausale pathogene Mutation handelt, kann durch die funktionelle Expression der identifizierten Mutation mit anschließender elektrophysiologischer Charakterisierung weiter abgeklärt werden.

Die vorliegende Arbeit konnte nachweisen, dass aktuelle Empfehlungen zur klinischen Diagnosestellung eines LQTS eine eingeschränkte Aussagekraft aufweisen und nicht geeignet sind genetisch betroffenen Patienten bei geringer Penetranz bestimmter Mutationen sicher zu identifizieren. In der Literatur wurden bereits mehrere Fälle beschrieben, in denen bis dahin klinisch unauffällige LQTS-Patienten mit normalen QTc-Zeiten an einem plötzlichen Herztod verstarben und retrospektive Studien konnten beim LQTS für Träger von Mutationen ein signifikant höheres Risiko für kardiale Arrhythmien als für Nichtbetroffene nachweisen (Priori et al., 2003). Molekulargenetische Untersuchungen sind beim Brugada-Syndrom aufgrund des hohen Anteils negativer genetischer Befunde bei symptomatischen Patienten bislang nicht etabliert. Zudem zeigten retrospektive Studien für Brugada-Syndrom-Patienten mit einer Mutation im Gen SCN5A kein erhöhtes Risiko für kardiale Ereignisse (Priori et al., 2002). Im Einzelfall (wie beim Indexpatienten A.K.) kann aber die genetische Diagnostik sowie die nachfolgende funktionelle Charakterisierung der Mutation die Pathogenese erklären helfen und wie beim Indexpatienten A.K. die Grundlage für eine medikamentöse Therapie darstellen (Chinidin gleicht die Imbalance der Repolarisation zwischen rechtem und linkem Ventrikel aus).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Strategie zur systematischen Untersuchung der Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei LQTS und Brugada-Syndrom an vier Patienten mit überlebtem plötzlichen Herztod dargestellt. Diese Methode basiert auf fünf Schritten:

1. Anamnese und Familienanamnese unter Berücksichtigung spezifischer Trigger für Arrhythmien oder Synkopen.
2. Ableitung eines Ruhe-Elektrokardiogramms und bei verlängerter QT_c-Zeit Durchführung einer Belastungs-EKG-Untersuchung jeweils mit Dokumentation von möglicherweise genotyp-hinweisenden spezifischen EKG-Veränderungen.
3. Kritische Anwendung etablierter klinischer Diagnosekriterien (Schwartz-Score bei LQTS-Patienten, medikamentöse Provokationstests bei Brugada-Syndrom-Patienten).
4. Bei klinischem Verdacht auf ein LQTS Durchführung einer genetischen Diagnostik durch Sequenzierung der häufigsten Krankheitsgene (KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1 und KCNE2). Bei klinischem Verdacht auf ein Brugada-Syndrom Sequenzierung des Gens SCN5A.
5. Funktionelle Charakterisierung der identifizierten Mutation in einem geeigneten Expressionsmodell.

Wie die Ergebnisse zeigten, korrelierten die elektrophysiologischen Untersuchungsergebnisse der mutierten Ionenkanäle mit den klinischen Symptomen der vier untersuchten Indexpatienten. Die Verwendung von Fusionsproteinen mit Detektierung unter dem Fluoreszenzmikroskop und Co-Expressions-Studien mit Mutanten und Wildtyp-Genen, sowie den jeweiligen β -Untereinheiten würden zusätzliche Aussagen über die Lokalisation der mutierten Ionenkanäle, das Auftreten dominant-negativer Effekte und die Interaktionen zwischen den jeweiligen Untereinheiten ermöglichen. Durch die Untersuchungsergebnisse der Familienangehörigen wurden jedoch die dargestellten Zusammenhänge relativiert und die Schwierigkeit der Genotyp-Phänotyp-Korrelation verdeutlicht. Die in dieser Arbeit nachgewiesene breite Heterogenität der klinischen Manifestation sowohl derselben Mutation innerhalb einer Familie, als auch benachbarter Mutationen bei LQTS und Brugada-Syndrom bestätigt bisherige Studienergebnisse, die zeigen konnten, dass die Expression eines mutierten Gens bei angeborenen Arrhythmiesyndromen nicht nur durch sein genetisches Milieu, sondern auch durch Alter, Geschlecht, Herzfrequenz und verschiedene andere Faktoren beeinflusst wird (Übersicht in Schulze-Bahr et al., 2003; Kääb und Schulze-Bahr, 2005). Die Aufklärung dieser zum Teil individuellen Modifikatoren und die hier aufgezeigten Kausalitäten zwischen Phänotyp, Mutationsnachweis und elektrophysiologischer Charakterisierung bei den Indexpatienten verdeutlichen die Notwendigkeit systematischer Untersuchungen von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bei diesen Erkrankungen. Das Modell der monogen erblichen Erkrankungen, zu denen das LQTS und das Brugada-Syndrom gezählt werden, wird daher gegenwärtig für diese Erkrankungen erweitert, unter Berücksichtigung modifizierender genetischer Effekte oder oligo- und polygener Modelle (Kääb und Schulze-Bahr, 2005).

5 Zusammenfassung

Kongenitale arrhythmogene Erkrankungen wie das LQTS und das Brugada-Syndrom sind dadurch charakterisiert, dass für die Betroffenen eine erhöhte Neigung zum Auftreten lebensbedrohlicher Herzrhythmusstörungen besteht. Obwohl es sich um relativ seltene Erkrankungen handelt, gelten sie heute aufgrund der umfangreichen molekularbiologischen und genetischen Untersuchungen der letzten Jahre als Modellerkrankungen molekularer Mechanismen der Arrhythmogenese. Als wesentliche Ursache für das angeborene LQTS und das Brugada-Syndrom wurden Mutationen in myokardialen Ionenkanälen identifiziert. Für das Verständnis der Arrhythmogenese bei Repolarisationsstörungen ist daher die funktionelle Charakterisierung dieser Mutationen entscheidend.

Solange eine routinemäßige molekulargenetische Untersuchung für alle Patienten mit Verdacht auf ein LQTS oder ein Brugada-Syndrom einen hohen Kosten- und Zeitaufwand darstellt und die genetischen Ursachen dieser Syndrome nicht weitestgehend identifiziert sind, wird sich die Diagnostik auf die phänotypische Charakterisierung der Betroffenen beschränken. Vor allem die elektrokardiographischen Symptome sind jedoch wenig sensitiv und nicht spezifisch (Vinzent et al., 1992; Moss et al., 1995). Zu den Vorteilen der genetischen Analyse zählen daher die Identifikation von Patienten mit einem LQTS oder Brugada-Syndrom unabhängig von der EKG-Diagnostik und vor der ersten Symptomatik, sowie gegebenenfalls die Identifikation bislang asymptomatischer betroffener Familienmitglieder. Deshalb ist es notwendig, dass Strategien zur systematischen Untersuchung, der Genotyp-Phänotyp Korrelation entwickelt werden, die eine individuelle Risikostratifizierung erlauben. Größere Studien zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation für identifizierte Mutationen können zudem helfen, die prädiktive molekulargenetische Diagnostik zur Charakterisierung von Risikogruppen zu etablieren. Diese Patienten können dann gezielt präventiven Maßnahmen zugeführt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des Zusammenhangs zwischen der Ausbildung klinischer Symptome, dem Nachweis ursächlicher Mutationen und der Veränderungen von Ionenkanaleigenschaften beim LQTS und beim Brugada-Syndrom. Dazu wurde bei vier Indexpatienten mit einem überlebten plötzlichen Herztod auf Grundlage der Symptome jeweils eine klinische Diagnose gestellt. Bei allen vier Indexpatienten konnte in der molekulargenetischen Analyse der Krankheitsgene eine Mutation nachgewiesen werden. Zur funktionellen Charakterisierung wurden die

identifizierten Mutationen durch zielgerichtete Mutagenese in die Wildtyp-Gene eingeführt und anschließend in einem geeigneten Zellmodell exprimiert. Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen an den funktionell exprimierten Mutationen mit Hilfe der Patch-Clamp Methode zeigten einen Zusammenhang zwischen den veränderten Kanaleigenschaften und den klinischen Charakteristika der einzelnen Indexpatienten.

An Hand des Stammbaums eines der Indexpatienten konnte eine breite Heterogenität der klinischen Manifestation derselben Mutation innerhalb einer Familie demonstriert werden. Damit wurden die Schlussfolgerungen anderer Studien bestätigt, dass bisher noch unbekannte Faktoren mit den Gendefekten interferieren und damit die Schwere des jeweiligen Phänotyps modifizieren. Zudem wurde gezeigt, dass lediglich die Identifizierung einer Mutation bei einem Patienten mit bekannter Erkrankung nicht ausreichend ist, um die phänotypische Präsentation zu erklären (Priori et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Strategie zur systematischen Untersuchung der Genotyp-Phänotyp Korrelation an vier Beispielen dargestellt. Durch die funktionelle Expression und elektrophysiologische Untersuchung der identifizierten Mutationen lassen sich individuelle Aussagen über die funktionellen Auswirkungen der Mutation treffen. Diese Aussagen können zur Risikostratifizierung beitragen, um durch die prophylaktische Behandlung, die Anpassung der Lebensgewohnheiten und das klinische Monitoring mögliche (weitere) kardiale Ereignisse zu verhindern.

Es zeigte sich weiterhin die Notwendigkeit nach genetischen Faktoren, wie unidentifizierte Krankheitsgene und modifizierende Genvarianten, sowie beeinflussenden extrinsischen Faktoren zu suchen um den komplexen Phänotyp beim LQTS und Brugada-Syndrom besser zu beschreiben und eine optimierte Risikostratifizierung und individualisierte Therapieformen zu erreichen.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott G.W.**, Sesti F., I. Splawski I., M.E. Buck M.E., M.H. Lehmann M.H., Timothy K.W., Keating M.T., Goldstein S.A.. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. 1999; 97:175–187
- Ackerman M.J.** The long QT syndrome: ion channel disease of the heart. *Mayo Clin Proc*. 1998; 73: 250-269
- Ackerman M.J.**, Tester D.J., Porter C.B. Swimming, a gene-specific arrhythmogenic trigger for inherited long QT syndrome. *Mayo Clin Proc*. 1999; 74: 1088-1094
- Ackerman M.J.**, Khositseth A., Tester D.J., Hejlik J.B., Shen W.K., Porter C.B. Epinephrine-induced QT interval prolongation: a gene-specific paradoxical response in congenital long QT syndrome. *Mayo Clin Proc*. 2002; 77: 413-421
- Alings M.**, Wilde. M. "Brugada" syndrome. Clinical data and suggested pathophysiological mechanism. *Circulation* 1999; 99: 666-673
- Antzelevitch C.**, Sicouri S. Clinical relevance of cardiac arrhythmias generated by afterdepolarizations: role of M cells in the generation of U waves, triggered activity and Torsades de Pointes. *J. A. Coll. Cardiol*. 1995; 23: 259-277
- Antzelevitch C.** The Brugada-Syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol*. 1998; 9: 513-516
- Antzelevitch C.** Ion channels and ventricular arrhythmias: cellular and ionic mechanisms underlying the Brugada-Syndrome. *Curr. Opin. Cardiol*. 1999; 14: 274 –279
- Antzelevitch C.** The Brugada-Syndrome: ionic basis and arrhythmia mechanisms. *J. Cardiovasc. Electrophysiol*. 2001; 12: 268–272
- Antzelevitch C.**, Brugada P., Brugada J., Brugada R., Shimizu W., Gussak I., Perez Riera A.R. Brugada-Syndrome - A Decade of Progress. *Circ. Res*. 2002; 91: 1114-1118
- Antzelevitch C.**, Brugada P., Borggrefe M., Brugada J., Brugada R., Corrado D., Gussak .I, LeMarec H., Nademanee K., Perez Riera A.R., Shimizu W., Schulze-Bahr E., Tan H., Wilde A. Brugada-Syndrome: report of the second consensus conference. *Circulation* 2005; 111: 659-670
- Balser J.R.** Sodium "channelopathies" and sudden death: must you be so sensitive? *Circ. Rec*. 1999; 85: 872-874
- Barhanin J.**, Lesage F., Guillemare E., Gink M., Lazdunski M., Romey G. K(v)LQT1 and Isk proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 1996; 384: 78-80

- Baroudi G.**, Acharfi S., Larouche C., Chahine M. Expression and intracellular localization of an SCN5A double mutant R1232W/T1620M implicated in Brugada-Syndrome. *Circ. Res.* 2002; 90: e11-e16
- Bazett H.C.** An analysis of time-relations of electrocardiograms. *Heart* 1920; 7: 353-370
- Benhorin J.**, Merri M., Alberti M., Locati E., Moss A.J., Hall W.J., Cui L. Long QT-Syndrome: new electrocardiographic characteristics. *Circulation* 1990; 82: 521-27
- Benhorin J.**, Medina A. Images in clinical medicine. Congenital long-QT-syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 1568
- Bezzina C.R.**, Veldkamp M.W., van Den Berg M.P., Postma A.V., Rook M.B., Viersma J.W., van Langen I.M., Tan-Sindhunata G., Bink-Boelkens M.T., van Der Hout A.H., Mannens M.M., Wilde A.A. A single Na-channel mutation causing both long-QT and Brugada-syndromes. *Circ. Res.* 1999; 85: 1206-1213
- Bezzina C.R.**, Rook M.B., Wilde A.A. Cardiac sodium channel and inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc. Res.* 2001; 41: 257-271
- Bidoggia H.**, Maciel J.P., Capalozza N., Mosca S., Blaksley E..J, Valverde E., Bertran G., Arini P., Biagetti M.O., Quinteiro R.A. Sex differences on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization: possible role of testosterone. *Am. Heart J.* 2000; 40: 678–83
- Brugada J.**, Brugada P. Further characterization of the syndrome of right bundle branch block, ST segment elevation, and sudden death. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 1997; 8:325-31
- Brugada J.**, Brugada R., Brugada P. Right bundle-branch block and ST-segment elevation in leads V1 through V3: a marker for sudden death in patients without demonstrable structural heart disease. *Circulation* 1998; 97: 457-460
- Brugada J.**, Brugada R., Brugada P. Pharmacological and device approach to therapy of inherited cardiac diseases associated with cardiac arrhythmias and sudden death. *J. Electrocardiol.* 2000; 33: 41–47
- Brugada J.**, Brugada R., Antzelevitch C., Tobwin J., Nadamanee K., Brugada P. Longterm follow-up of individuals with the electrographic pattern of right bundle-branch block and ST-segment elevation in precordial leads V1 to V3. *Circulation* 2002; 105: 73-78
- Brugada J.**, Brugada R., Brugada P. Determinants of sudden cardiac death in Individuals with electrocardiographic pattern of Brugada-Syndrome and no previous cardiac arrest. *Circulation* 2003; 108: 3092-3096

Brugada P., Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: A distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1992; 20: 1391-1396

Brugada P., Brugada R., Antzelevitch C., Brugada J. The Brugada-Syndrome. *Arch. Mal. Coeur. Vaiss.* 2005; 98: 115-22

Brugada R., Brugada J., Antzelevitch C., Kirsch G.E., Potenza D., Tobwin J.A., Brugada P. Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation* 2000;101: 510-515

Buob A., Siaplaouras S., Bohm M., Jung J. Differentialdiagnose des idiopathischen Kammerflimmerns. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2002; 127: 2517-2523

Catterall W.A. Structure and function of voltage sensitive ion channels. *Science* 1988; 242: 50-61

Chen Q., Kirsch G.E., Zhang D., Brugada R., Brugada J., Brugada P., Potenza D., Moya A., Borggreffe M., Breithardt G., Ortiz-Lopez R., Wang Z., Antzelevitch C., O'Brien E.E., Schulze-Bahr E., Keating M.T., Towbin J.A., Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998; 392: 293-296

Chiang C., Roden D.M. The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 36: 1-2

Chiang C. Congenital and Acquired Long QT Syndrome. *Current Concepts and Management. Cardiol. Rev.* 2004; 12: 222-234

Choi G., Kopplin L.J., Tester D.J., Will M.L., Haglund C.M., Ackerman M.J. Spectrum and frequency of cardiac channel defects in swimming-triggered arrhythmia syndromes. *Circulation* 2004; 110: 2119-2124

Chouabe C., N Neyroud N., Guicheney P., Lazdunski M., Romey G., Barhanin J. Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J.* 1997; 16: 5472-5479

Curran M.E., Splawski I., Timothy K.W., Vincent G.M., Green E.D., Keating M.T. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995; 80: 795–803

Dessertenne F. Ventricular tachycardia with 2 variable opposing foci. *Arch. Mal. Coeur.* 1966; 59: 263-272

Day C.P., McComb J.M., Campbell R.W. QT-dispersion: an indication of arrhythmia risk in patients with long QT intervals. *Br. Heart J.* 1990; 63: 342-344

Donger C., Denjoy I., Berthet M., Neyroud N., Cruaud C., Bennaceur M., Chivoret G., Schwartz K., Coumel P., Guicheney P. KVLQT1 C-terminal missense mutation causes a forme fruste long-QT syndrome. *Circulation* 1997; 96: 2778-2781

Dorostkar P.C., Eldar M., Belhassen B., Scheinman M.M. Long-term follow-up of patients with long-QT syndrome treated with beta-blockers and continuous pacing. *Circulation* 1999; 100: 2431-2436

Eckardt L., Probst V., Smits J.P., Bahr E.S., Wolpert C., Schimpf R., Wichter T., Boisseau P., Heinecke A., Breithardt G., Borggrefe M., LeMarec H., Bocker D., Wilde A.A. Long-term prognosis of individuals with right precordial ST-segment-elevation Brugada-Syndrome. *Circulation* 2005; 111: 257-263

Etheridge S.P., Compton S.J., Tristani-Firouzi M., Mason J.W. A new oral therapy for long QT syndrome: long-term oral potassium improves repolarization in patients with HERG mutations. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 42: 1777-1782

Fodstad H., Swan H., Auberson M., Gautschi I., Loffing J., Schild L., Kontula K. Loss-of-function mutations of the K (+) channel gene KCNJ2 constitute a rare cause of long QT syndrome. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004; 37: 593-602

Fraser G.R., Froggatt P., Murphey T. Genetical aspects of the cardioauditory syndrome of Jervell and Lange-Nielsen. *Ann. Hum. Genet.* 1964; 28: 133-157

Garson F., Dick M., Fournier A., Gillette P.C., Hamilton R., Kugler J.D., van Hare G.F., Vetter V., Vick G.W. The long-QT-Syndrome in children. An international study of 287 patients. *Circulation* 1993; 87: 1866-1872

Garson A. How to Measure the QT - Intervall - What Is Normal? *Am. J. Cardiol.* 1993; 72: 14B-16B

Grant A.O. Molecular biology of sodium channels and their role in cardiac arrhythmias. *Am. J. Med.* 2001; 110: 296-305

Higuchi R., Krummel B., Saiki R.K. Overlap-Extension-PCR. *Nucl. Acids Rec.* 1988; 16: 7531

Jan L.Y., Jan Y.N. How might the diversity of potassium channel be generated? *Trends Neurosci.* 1990; 13: 415-419

Jongbloed R.J., Wilde A.A., Geelen J.L., Doevendans P., Schaap C., Van Langen I, van Tintelen J.P., Cobben J.M., Beaufort-Krol G.C., Geraedts J.P., Smeets H.J. Novel KCNQ1 and HERG missense mutations in Dutch long-QT families. *Hum. Mutat.* 1999; 13: 301-310

January C.T., Riddle J.M. Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block: A role for L-type Ca²⁺ current. *Circ. Res.* 1989; 64: 977-990

Jervell A., Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden cardiac death. *Am. Heart J.* 1957; 54: 59-68

Jiang C., Atkinson D., Tobwin J.A., Splawski I., Lehmann M.H., Li H., K. Timothy, R.T. Taggart, P.J. Schwartz, G.M. Vincent. Two long QT syndrome loci map to chromosome 3 and 7 with the evidence for further heterogeneity. *Nat. Genet.* 1994; 8: 141-147

Kääb S., Schulze-Bahr E. Susceptibility genes and modifiers for cardiac arrhythmias. *Cardiovasc. Res.* 2005; 67: 397-413.

Kambouris N.G., Nuss H.B., Johns D.C., Tomaselli G.F., Marban E., Balser J.R. Phenotypic characterization of a novel long-QT syndrome mutation (R1623Q) in the cardiac sodium channel. *Circulation* 1998; 97: 640-644

Kamiya K., Mitcheson J.S., Yasu K., Kodama I., Sanguinetti M.C. Open channel block of HERG K(+) channels by vesnarinone. *Mol. Pharmacol.* 2001; 60: 244-253

Kass R.S. Delayed potassium channels in the heart: regulatory and molecular properties. In: Morad M., Ebashi S., Trautwein W., Kurachi E. *Molecular Physiology and Pharmacology of Cardiac Ion Channels and Transporters*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1996

Kass R.S., Moss A.J. Long QT syndrome: novel insights into the mechanisms of cardiac arrhythmias. *J. Clin. Invest.* 2003; 112: 810–815

Keating M.T., Atkinson D., Dunn C., Timothy K., Vincent G.M., Leppert M. Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras - 1 gene. *Science* 1991; 252: 704-706

Kurokawa J., Abriel H., Kass R.S. Molecular Basis of the Delayed Rectifier Current I(Ks) in Heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2001; 33: 873–882

Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K. Voltage-Gated Ion Channels and Hereditary Disease. *Physiol. Rev.* 1999; 79: 1317-1372

Lehmann M.H., Suzuki F., Fromm B.S., Frankovich D., Elko P., Steinman R.T., Fresard J., Baga J.J., Taggart R.T. T wave “humps” as a potential electrocardiographic marker of the long QT syndrom. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1994; 24: 746-754

Makielski J.C., Ye B., Valdivia C.R., Pagel M.D., Pu J., Tester D.J., Ackerman M.J. A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circ. Res.* 2003; 93: 821-828

Makita N., Shirai N., Nagashima M., Matsuoka R., Tohse N., Kitabatake A. A de novo missense mutation of human cardiac Na⁺ channel exhibiting novel molecular mechanisms of long QT syndrome. *FEBS Lett.* 1998; 423: 5-9

Malfatto G., Beria G., Sala S., Bonazzi O., Schwartz P.J. Quantitative analysis of T-wave abnormalities and their prognostic implications in the idiopathic long QT syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1994; 23: 296-301

- Marban E.**, Yamagishi T., Tomaselli G.F. Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J. Physiol.* 1998; 508: 647-657
- Marban E.** Heart failure: the electrophysiologic connection. *J. Cardiovasc. Physiol.* 1999; 10: 1425-1438
- Marban E.** Cardiac channelopathies. *Nature* 2002; 415: 213-218
- Marx S.O.**, Kurokawa J., Reiken S., Motoike H., D'Armiento J., Marks A.R., Kass R.S. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* 2002; 295: 496-499
- Matsuo K.**, Kurita T., Inagaki M., Kakishita M., Aihara N., Shimizu W., Taguchi A., Suyama K., Kamakura S., Shimomura K. The circadian pattern of the development of ventricular fibrillation in patients with Brugada-Syndrome. *Eur. Heart J.* 1999; 20: 465-470
- Melman Y.F.**, Krumer A., McDonald T.V. A single transmembrane site in the KCNE-encoded proteins controls the specificity of the KvLQT1 channel gating. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 25187-25194
- Merri M.**, Benhorin J., Alberti M., Locati E., Moss A.J. Electrocardiographic quantitation of ventricular repolarization. *Circulation* 1989; 89: 1301-1308
- Miller T.E.**, Estrella E., Myerburg R.J., Garcia de Viera J., Moreno N., Rusconi P., Ahearn M.E., Baumbach L., Kurlansky P., Wolff G., Bishopric N.H.. Recurrent third-trimester fetal loss and maternal mosaicism for long-QT syndrome. *Circulation* 2004; 109: 3029-3034
- Mitcheson J.S.**, Chen J., Lin M., Culberson C., Sanguinetti M.C. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 12329–12333
- Mohler P. J.**, Schott J., Gramolini A.O., Dilly K. W., Guatimosim S., duBell W.H., Song L., Haurogne K. , Kyndt F., Ali M.E., Rogers T.B., Lederer W.J., Escande D., Le Marec H., Bennett V. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 2003; 421: 634-639
- Moss A.J.** Measurement of the QT-interval and the risk associated with QT-interval prolongation: A review. *Am. J. Cardiol.* 1993; 72: 23B-25B
- Moss A.J.**, Zareba W., Benhorin J., Locati E.H., Hall W.J., Robinson J.L., Schwartz P.J., Towbin J.A., Vincent G.M., Lehmann M.H. Electrocardiographic T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long-QT syndrome. *Circulation* 1995; 92: 2929-2934.
- Moss A.J.**, Zareba W., Hall W.J., Schwartz P.J., Benhorin J., Vincent G.M., Locati E.H., Priori S.G., Napolitano C.. Effectiveness and limitations of β -blocker therapy in congenital long QT syndrome. *Circulation* 2000; 101: 616-623

Moss A.J., Kass R.S. Long QT Syndrome: from channels to cardiac arrhythmias. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 2018-2024

Näbauer M., Beuckelmann D.J., Überfuhr P. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 1996; 93: 168-177

Neher E., Sackmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976; 260: 799-780

Neyroud N., Tesson F., Denjoy I., Leibovici M., Donger C., Guicheney P. A novel potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory Syndrome. *Nat. Genet.* 1997; 15: 186-189

Neyroud N., Richard P., Vignier N., Donger C., Denjoy I., Demay L., Shkolnikova M., Pesce R., Chevalier P., Hainque B., Goumel P., Schwartz K., Guicheney P. Genomic organisation of the KCNQ1 K⁺ channel gene and identification of C-terminal mutations in the long QT syndrome. *Circ. Res.* 1999; 84: 290-297

Papazian D.M., Timpe L.C., Jan Y.N., Jan L.Y. Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 1991; 349: 305-310

Pham T.V., Rosen M.R. Sex, hormones, and repolarization. *Cardiovasc. Res.* 2002; 53: 740-751

Plaster N.M., Tawil R., Tristani-Firouzi M., Canun S., Bendahhou S., Tsunoda A., Donaldson M.R., Iannaccone S.T., Brunt E., Barohn R., Clark J., Deymeer F., George A.L. Jr, Fish F.A., Hahn A., Nitu A., Ozdemir C., Serdaroglu P., Subramony S.H., Wolfe G., Fu Y.H., Ptacek L.J. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* 2001; 105: 511–519

Pfeuffer A., Jalilzadeh S., Perz S., Mueller J.C., Hinterseer M., Illig T., Akyol M., Huth C., Schöpfer-Wendels A., Steinbeck G., Holle R., Näbauer M., Wichmann H.-E., Meitinger T., Kääh S. Common variants in myocardial ion channel genes modify the QT interval in the general population. *Circ. Res.* 2005; 96: 693-701

Priori S.G., Napolitano C., Diehl L., Schwartz P.J. Dispersion of the QT interval. A marker of therapeutic efficacy in the idiopathic long QT syndrome. *Circulation* 1994; 89: 1681-1689

Priori S.G., Schwartz P.J., Napolitano C., Bianchi L., Dennis A., De Fusco M., Brown A.M., Casari G. A recessive variant of the Romano-Ward long-QT-syndrome? *Circulation* 1998; 97: 2420-2425

Priori S.G., Barhanin J., Hauer R., Haverkamp W., Jongsma H.J., Kleber A.G., McKenna W.J., Roden M.D., Rudy Y., Schwartz K., Schwartz P.J., Towbin J.A., Wilde A.. Genetic and molecular basis of the cardiac arrhythmias: impact on clinical management. *Circulation* 1999; 99: 518-528

- Priori S.G.**, Napolitano C., Schwartz P.J. Low penetrance in the long QT syndrome – clinical impact. *Circulation* 1999; 99: 529-533
- Priori S.G.**, Napolitano C., Gasparini M., Pappone C., Della Bella P., Brignole M., Giordano U., Giovannini T., Menozzi C., Bloise R., Crotti L., Terreni L., Schwartz P.J. Clinical and genetic heterogeneity of right bundle branch block and ST-segment elevation syndrome: a prospective evaluation of 52 families. *Circulation* 2000a; 102: 2509–2515
- Priori S.G.**, Napolitano C., Schwartz P.J., Bloise R., Crotti L., Ronchetti E. The elusive link between LQT3 and Brugada-Syndrome: the role of flecainide challenge. *Circulation* 2000b; 102: 945-947
- Priori S.G.**, Aliot E., Blomstrom-Lundqvist C., Bossaert L., Breithardt G., Brugada P., Camm A.J., Cappato R., Cobbe S.M., Di Mario C., Maron B.J., McKenna W.J., Pedersen A.K., Ravens U., Schwartz P.J., Trusz-Gluza M., Varda P., Wellens H.J., Zipes D.P. Task force on sudden death of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 2001; 22: 1374-1450
- Priori S.G.**, Napolitano C., Gasparini M., Pappone C., Della Bella P., Giordano U., Bloise R., Giustetto C., De Nardis R., Grillo M., Ronchetti E., Faggiano G., Nastoli J. Natural History of Brugada-Syndrome - Insights for Risk Stratification and Management. *Circulation* 2002; 105: 1342-1347.
- Priori S.G.**, Schwartz P.J., Napolitano C., Bloise R., Ronchetti E., Grillo M., Vicentini A., Spazzolini C., Nastoli J., Bottelli G., Folli R., Cappelletti D. Risk Stratification in the Long-QT Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 1866-1874
- Priori S.G.** Inherited arrhythmogenic diseases. The complexity beyond monogenic disorders. *Circ. Res.* 2004a; 94: 140-145
- Priori S.G.**, Napolitano C., Schwartz P.J., Grillo M., Bloise R., Ronchetti E., Moncalvo C., Bottelli G., Nastoli J. Association of long QT syndrome loci and cardiac events among patients treated with beta-blockers. *JAMA* 2004b; 292: 1341-1344
- Rasmusson R.L.**, Morales M.J., Wang S., Liu S., Campell D.L., Strauss H.C. Inactivation of voltage-gated cardiac K⁺channel. *Circ. Res.* 1998; 82: 739-750
- Rautaharju P.M.**, Zhou S.H., Wong S., Calhoun H.P., Berenson G.S., Prineas R., Davignon A. Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can. J. Cardiol.* 1992; 8: 690-695
- Robbins J.** KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Ther.* 2001; 90: 1-19
- Roden D.M.**, Spooner P.M. Inherited long QT syndromes: a paradigm for understanding arrhythmogenesis. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 1999; 10: 1664-1683

- Roden D.M.** The Problem, Challenge and Opportunity of Genetic Heterogeneity in Monogenic Diseases Predisposing to Sudden Death. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 40: 357-359
- Roden D.M.** Drug-Induced Prolongation of the QT Interval. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 1013-1022
- Romano C.**, Gemme G., Pongiglione R. Aritmie cardiache rare dell'eta pediatrica. *Clin. Pediatr.* 1963; 45: 656-683
- Sanger F.**, Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1977; 74: 5463-5467
- Sanguinetti M.C.**, Jurkiewicz N.K. Delayed rectifier outward K⁺current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am. J. Physiol.* 1991; 260: H393-H399
- Sanguinetti M.C.**, Jurkiewicz N.K.. Role of external Ca and K in gating of cardiac delayed rectifier K currents. *Pflugers Arch.* 1992; 420: 180-186
- Sanguinetti MC.**, Jiang C., Curran M.E., Keating M.T. A mechanism link between an inherited and acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* 1995; 81: 299-307
- Sanguinetti M.C.**, Curran M.E., Zou A., Shen J., Spector P.S., Atkinson D.L., Keating M.T. Coassembly of K(v)LQT1 and mink proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 1996a; 384: 80-83
- Sanguinetti M.C.**, Curran M.E., Spector P.S., Keating M.T. Spectrum of HERG K-channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1996b; 93: 2208-2212
- Sans S.**, Kesteloot H., Kromhout D. The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe. Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. *Eur. Heart. J.* 1997; 18: 1231-1248
- Sato C.**, Sato M., Iwasaki A., Doi T., Engel A. The sodium channel has four domains surrounding a central pore. *J. Struct. Biol.* 1998; 121: 314-325
- Schott J.J.**, Charpentier F., Peltier S., Foley P., Drouin E., Bouhour J.B., Donnelly P., Vergnaud G., Bachner L., Moisan J.P. Mapping of a gene for long QT syndrome on chromosome 4q25-27. *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 57: 1114-1122
- Schulze-Bahr E.**, Eckardt L., Breithardt G., Seidl K., Wichter T., Wolpert C., Borggrefe M., Haverkamp W. Sodium channel gene (SCN5A) mutations in 44 index patients with Brugada-Syndrome: different incidences in familial and sporadic disease. *Hum. Mutat.* 2003; 21: 651-660
- Schwartz P.J.** The long QT syndrome. In: H.E. Kulbertus. Sudden Death. The Hague, Netherlands: Martinus Nijhoff; 1980: 358-378

- Schwartz P.J.** The idiopathic long QT syndrome: the need for a prospective registry. *Eur. Heart J.* 1983; 4:529-531
- Schwartz P.J.** Idiopathic long-QT-syndrome: progress and question. *Am. Heart J.* 1985; 109: 399-411
- Schwartz P.J.**, Moss A.J., Vincent G.M., Crampton R.S. Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation* 1993; 88: 782-784
- Schwartz P.J.**, Priori S.G., Locati E.H., Napolitano C., Cantu F., Towbin J.A., Keating M.T., Hammoude H., Brown A.M., Chen L.S. Long QT syndrome patients with mutations of the SCN5A and HERG genes have differential responses to Natrium+ channel blockade and to increases in heart rate. Implications for gene specific therapy. *Circulation* 1995; 92: 3381-3386
- Schwartz P.J.**, Stramba-Badiale M., Segantini A., Austoni P., Bosi G., Giorgetti R., Grancini F., Marni E.D., Perticone F., Rosti D., Salice P. Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1998; 338: 1709-1714
- Schwartz P.J.**, Priori S.G., Spazzolini C., Moss A.J., Vincent G.M., Napolitano C., Denjoy I., Giuncheney P., Breithardt G., Keating M.T., Towbin J.A., Bloise R. Genotype-phenotype correlation in the long-QT-syndrome: gene-specific triggers for the life-treating arrhythmias. *Circulation* 2001; 103: 89-95
- Schwartz P.J.**, Priori S.G., Napolitano C. How really rare are rare diseases?: The intriguing case of independent compound mutations in the LQTS. *J. Cardiovasc. Electrophysiology* 2003; 14: 1120-1121
- Schwartz P.J.**, Priori S.G., Cerrone M., Spazzolini C., Odero A., Napolitano C., Bloise R., De Ferrari G.M., Klersy C., Moss A.J., Zareba W., Robinson J.L., Hall W.J., Toivonen L., Hu D. Left cardiac sympathetic denervation in the management of the high risk patients affected by the long-QT-syndrome. *Circulation* 2004; 109: 1826-1833
- Shalaby F.Y.**, Levesque P.C., Yang W.P., Little W.A., Blonar M. Dominant-negative KvLQT1 mutations underlie the LQT1 form of the Long QT syndrome. *Circulation* 1997; 96: 1733-1736
- Smits J.P.**, Eckardt L., Probst V., Bezzina C., Schott J., Remme C., Haverkamp W., Breithardt G., Escande D., Schulze-Bahr E., LeMarec H., Wilde A. Genotype-Phenotype Relationship in Brugada-Syndrome: Electrocardiographic Features Differentiate SCN5A-Related Patients From Non-SCN5A-Related Patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 40: 350–356
- Splawski I.**, Tristani-Firouzi M., Lehmann M.H., Sanguinetti M.C., Keating M.T. Mutations in the minK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat. Genet.* 1997; 17: 338–340

Splawski I., Timothy K.W., Vincent G.M., Atkinson D.L., Keating M.T. Molecular Basis of the Long-QT Syndrome Associated with Deafness. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 1562-1567

Splawski I., Shen J., Timothy K.W., Vincent G.M., Lehmann M.H., Keating M.T. Genomic structure of three long QT syndrome genes KVLQT1, HERG, and KCNE1. *Genomics* 1998; 51: 86-97

Splawski I., Shen J., Timothy K.W., Lehmann M.H., Priori S., Robinson J.L., Moss A.J., Schwartz P.J., Towbin J.A., Vincent G.M., Keating M.T. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. *Circulation* 2000; 102: 1178-1185

Stühmer W., Conti F., Suzuki H., Wang X.D., Noda M., Yahagi N., Kubo H., Numa S. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 1989; 339: 597-603

Swan H., Viitasalo M., Piippo K., Laitinen P., Kontula K., Toivonen L. Sinus node function and ventricular repolarisation during exercise stress test in long QT syndrome patients with KvLQT1 and HERG potassium channel defects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999; 34: 823-829

Takenaka K., Ai T., Shimizu W., Kobori A., Ninomiya T., Otani H., Kubota T., Takaki H., Kamakura S., Horie M. Exercise stress test amplifies genotype-phenotype correlation in the LQT1 and LQT2 forms of the long-QT syndrome. *Circulation.* 2003; 107: 838-844

Takumi T., Ohkubo H., Nakanishi S. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage gated potassium current. *Science* 1988; 242: 1042-1045

Tapper A.R., George A.L. MinK subdomains that mediate modulation of and association with KvLQT1. *J. Gen. Physiol.* 2000; 116: 379-390

Tawil R., Ptacek L.J., Pavlakis S.G., De Vito D.C., Penn A.S., Ozdemir A.S. Andersen's syndrome: potassium-sensitive periodic paralysis, ventricular ectopy, and dysmorphic features. *Ann. Neurol.* 1994; 35: 326-330

Tristani-Firouzi M., Sanguinetti M.C. Voltage-dependent inactivation of the human K⁺ channel KvLQT1 is eliminated by association with minimal K⁺ channel subunits. *J. Physiol.* 1998; 510: 37-45

Tristani-Firouzi M., Chen J., Mitcheson J.S., Sanguinetti M.C. Molecular Biology of K⁺ Channels and Their Role in Cardiac Arrhythmias. *Am. J. Med.* 2001; 110: 50 –59

Tristani-Firouzi M., Jensen J.L., Donaldson M.R., Sansone V., Meola G., Hahn A. Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7. *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 381-388

Valdivia C.R., Nagatomo T., Makielski J.C. Late Na currents affected by alpha subunit isoform and beta1 subunit co-expression in HEK293 cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2002; 34: 1029-1039.

- Vatta M.**, Li H., Towbin J.A. Molecular biology of arrhythmic syndromes. *Curr. Opin. Cardiol.* 2000; 15: 12-22
- Villain E.**, Levy M., Kachaner J., Garson A. Prolonged QT-Interval in neonates: Benign, transient, or prolonged risk of sudden death. *Am. Heart J.* 1992; 124: 194-917
- Vincent G.M.** The heart rate of the Romano-Ward syndrome patients. *Am. Heart J.* 1986;112: 61-64
- Vincent G.M.** The molecular genetics of the long QT syndrome: genes causing fainting and sudden death. *Annu. Rev. Med.* 1998; 49: 263-74
- Vincent G.M.**, Timothy K.W., Leppert M., Keating M. The spectrum of symptoms and QT intervals in carriers of the gene for the long-QT syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1992; 327: 846-852
- Vincent G.M.** The long-QT syndrome - bedside to bench to bedside. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 1866-1874
- Viskin S.** Cardiac pacing in the long QT syndrome: a review of available data and practical recommendations. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2000; 11: 593-600
- Walker B.D.**, Krahm A.D., Klein G.J., Skanes A.C., Yee R. Burst bicycle exercise facilitates diagnosis of latent long QT syndrome. *Am. Heart J.* 2005; 150: 1059-1063
- Ward O.** A new familial cardiac syndrome in children. *J. Irish Med. Assoc.* 1964; 54: 103-106
- Wang Q.**, Shen J., Splawski I., Atkinson D., Li Z., Robinson J.L., Moss A.J., Towbin J.A., Keating M.T. SCN5A mutations associated cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995; 80: 805-811
- Wang Q.**, Curran M.E., Splawski J., Burn T.C., Millholland J.M., VanRaay T.J., Shen J., Timothy K.W., Vincent G.M., De Jager T., Schwartz P.J., Towbin J.A., Moss A.J., Atkinson D.L., Landes G.M., Connors T.D., Keating M.T. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat. Genet.* 1996a; 12: 17-23
- Wang Q.**, Li Z., Shen J., Keating M.T. Genomic organization of the human SCN5A gene encoding the cardiac sodium channel. *Genomics* 1996b; 34: 9-16
- Weidmann S.** Effect of current flow on the membrane potential of cardiac muscle. *J. Physiol.* 1951; 115: 227-236
- Westenskow P.**, Splawski I., Timothy K.W., Keating M.T., Sanguinetti M.C. Compound mutations: a common cause of severe long-QT syndrome. *Circulation* 2004;109: 1834-1841

Wilde A., Antzelevitch C., Borggrefe M., Brugada J., Brugada R., Brugada P., Corrado D., Hauer R., Kass R.S., Nademanee K., Priori S.G., Towbin J.A. for the Study Group on the Molecular Basis of Arrhythmias of the European Society of Cardiology. Proposed Diagnostic Criteria for the Brugada-Syndrome - Consensus Report. *Circulation* 2002; 106: 2514-2519

Wollnik B., Schroeder B.C., Kubisch C., Esperer H.D., Wiesacker P., Jentsch T.J. Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive KVLQT1 K-channel mutations found in inherited cardiac arrhythmias. *Hum. Mol. Genet.* 1997; 6: 1943-1949.

Yan G.X., Antzelevitch C. Cellular basis for the electrocardiographic J-Wave. *Circulation* 1996; 93: 372-379

Zareba W., Moss A.J., Schwartz P.J., Vincent G.M., Robinson J.L., Priori S.G., Benhorin J., Locati E.H., Towbin J.A., Keating M.T., Lehmann M.H., Hall W.J. Influence of the genotype on the clinical course of the long-QT syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 965-960

Zareba W., Moss A.J., Locati E.H., Lehmann M.H., Peterson D.R., Hall W.J., Schwartz P.J., Vincent G. M., Priori, S.G., Benhorin J., Towbin J.A., Robinson J.L., Andrews M.L., Napolitano C., Timothy K., Zhang L., Medina A. International Long QT Syndrom Registry. Modulating effects of age and gender on the clinical course of long QT syndrome by genotype. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003a; 42: 103-109

Zareba W., Moss A.J., Sheu G., Kaufman E.S., Priori S.G., Vincent G.M., Towbin J.A., Benhorin J., Schwartz P.J., Napolitano C., Hall W.J., Keating M.T., Qi M., Robinson J.L., Andrews M.L. Location of mutation in the KCNQ1 and phenotypic presentation of long QT syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2003b; 11: 1149-1153

Zhang L., Timothy K.W., Vincent M., Lekmann M.H., Fox J., Giuli L.C., Shen J., Slawski I., Priori S.G., Compton S.J., Yanowitz F., Benhorin J., Moss A.J., Schwartz P.J., Robinson J.L., Wang Q., Zareba W., Keating M.T., Towbin J.A., Nopiltano C., Medina A. Spectrum of ST-T-Wave Patterns and Repolarization Parameters in Congenital Long-QT Syndrome. *Circulation* 2000; 102: 2849-2855

7 Danksagungen

Ich möchte mich an erster Stelle bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Kääh für die sehr gute Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Wir sind zusammen einen langen Weg gegangen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Heike Kartmann (MTA) für ihre engagierte Hilfe zum experimentellen Teil meiner Promotion. Herrn Dr. med. Andreas Barth und Herrn Dr. med. Ludwig Zwermann danke ich für die Unterstützung bei den Patch-Clamp Messungen.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Peter Lohse und seiner Arbeitsgruppe am Institut für Klinische Chemie der Universität München, Klinikum Großhadern, bedanke ich mich für die Durchführung der Gensequenzierungen.

Darüber hinaus fühle ich mich für die finanzielle Unterstützung durch ein Stipendium bei der Rudolf und Brigitte Zenner Stiftung zu Dank verpflichtet.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Ehefrau Martina, meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mir stets mit Motivation und Rat zur Seite standen.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefan Schäfer
Adresse: Happurgerstr. 109b, 90482 Nürnberg
Geburtsdatum: 21. Juli 1973
Geburtsort: Berlin
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familie: Ehefrau: Martina Maria Schäfer, geb. Pieper, Kinderkrankenschwester, verheiratet seit dem 31.05.2002
Tochter: Annabell Maria
Vater: Prof. Dr. Klaus Schäfer, Diplom-Physiker
Mutter: Margot Schäfer, Diplom-Regisseurin
Bruder: Dr. rer. nat. Matthias Schäfer, Diplom-Biologe
Schwester: Susanne Schäfer, Studentin der Politikwissenschaften

Schulausbildung

1980 - 1991 Grundschule und Gymnasium in Berlin
1991 - 1993 Gymnasium in Garmisch-Partenkirchen
Juni 1993 Abitur am Werdenfels-Gymnasium, Garmisch-Partenkirchen

Wehrdienst

1993 - 1994 Sanitäter an der Gebirgs- und Winterkampfschule, Mittenwald

Studium

November 1994 Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
August 1997 Physikum
August 1999 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2001 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2002 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Abschluss des Studiums der Humanmedizin

Beruflicher Werdegang

2002 - 2004	Arzt im Praktikum in der Kinderklinik Dritter Orden, München
2004 - 2006	Assistenzarzt in der Kinderklinik St. Marien, Landshut
seit 2006	Assistenzarzt im Zentrum für Neugeborene, Kinder und Jugendliche im Klinikum Nürnberg

Promotion

seit 1998	Doktorand in der Arbeitsgruppe Herzgenetik: Familiäre Arrhythmiesyndrome und Plötzlicher Herztod, geleitet von Priv.-Doz. Dr. med. Kääb am Klinikum der LMU München, Großhadern
Juli 2002 - Juni 2003	Stipendium der Rudolf und Brigitte Zenner Stiftung

Publikationen

Schäfer S., Kartmann H., Näbauer M., Kääb S. Genetische Stufendiagnostik und funktionelle Expression neuer Mutationen myokardialer Ionenkanäle bei angeborenem Long-QT-Syndrom. Postervortrag auf dem Research-Festival der Medizinischen Fakultät der LMU München, 13. Oktober 2000 in München

Hinterseer M., Schäfer S., Wahl C., Näbauer M., Kääb S. Genetische Stufendiagnostik und funktionelle Expression einer neuen Mutation auf dem Gen KCNQ1 bei einem 12-jährigen Jungen nach Beinahe-Ertrinken. Vortrag auf der 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Herz- und Kreislaufforschung, 19. April 2001 in Mannheim

Schäfer S., Hinterseer M., Wahl C., Näbauer M., Kääb S. A novel mutation in the potassium channel gene KCNQ1 - electrophysiological characterization. Postervortrag auf dem LMU-Forum für interventionelle Elektrophysiologie, 5. Oktober 2001 in München